

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу М.В. Пустоваловой "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

Широкое внедрение рентгенологических методов и методов радионуклидной диагностики, профессиональная деятельность в сфере атомной промышленности, развитие космических исследований и планирование дальних космических полетов сопряжены с облучением или возможностью облучения тела человека или его отдельных органов и тканей в малых и даже низких дозах. Сведения о биологических эффектах малых доз ограничены, хотя они крайне важны, так как эти данные являются основой для разработки национальных законодательных актов разных стран в сфере радиационной защиты и радиационного нормирования. Мезенхимальные стволовые клетки (многопотентные стромальные стволовые клетки, МСК) - длительно существующие клетки, которые присутствуют во всех органах и тканях, способны дифференцироваться в нескольких направлениях, секрецируют широкий спектр факторов роста, цитокинов и хемокинов, что определяет их важную роль в процессах восстановления тканей и регуляции процессов регенерации. Эти свойства МСК привели к развитию методов клеточной терапии с использованием МСК при развитии различных дегенеративных процессов, в том числе и после действия ионизирующего излучения. МСК могут подвергаться старению, сопровождающему изменением их функций и спектра секрецируемых цитокинов. Поэтому свойства МСК могут зависеть от возраста человека, в экспериментах *in vitro* и от возраста культуры, который определяется длительностью культивирования клеток, и от тех воздействий, которым могли подвергаться МСК. Поэтому цель диссертационной работы М.В. Пустоваловой, сформулированная как изучение ранних (до 24 ч) и отдаленных (до 11 пассажа, а это около 2,5 месяцев) эффектов воздействия ионизирующего излучения в малых дозах в МСК человека, безусловно, является актуальной как с научной, так и с практической точки зрения.

Для выполнения поставленной цели автором были сформулированы следующие три задачи:

1. Провести исследования закономерностей репарации двунитевых разрывов (ДР) ДНК в культивируемых МСК человека, подвергшихся воздействию

ВХОД №	1079
ДАТА	06.09.2008
КОЛ-ВО ЛИСТОВ:	6
ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России	

рентгеновского излучения в малых дозах в ранние сроки после облучения (до 24 ч).

2. Изучить особенности изменений количества ДР ДНК в отдаленные сроки (до 11 клеточных пассажей) после облучения МСК человека в малой и средней дозах рентгеновского излучения.

3. Провести сравнительный анализ изменений, ассоциированных с клеточным старением и нестабильностью генома в отдаленные сроки после облучения МСК (до 11 клеточных пассажей) в малой дозе рентгеновского излучения.

Следует отметить, что анализ диссертации свидетельствует о том, что в действительности автором была сформулирована и решена еще одна важная задача, касающаяся изучения накопления спонтанных ДР ДНК в длительно-культивируемых МСК человека для выбора оптимальных для проведения работы условий культивирования клеток.

Диссертационная работа М.В. Пустоваловой построена по классическому принципу и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, описание результатов исследования, заключение, выводы и список литературы.

Обзор литературы занимает 33 стр. и представлен четырьмя разделами. Первый из них посвящен анализу свойств мезенхимальных стволовых клеток человека и областям их применения в клеточной терапии. Во втором разделе обзора подробно анализируются сведения, касающиеся роли и места двунитевых разрывов ДНК. Затем, в третьем разделе, автор приводит данные об основных механизмах репарации двунитевых разрывов ДНК и их роли в судьбе клетки. Четвертый раздел посвящен рассмотрению особенностей действия ионизирующего излучения в малых дозах на мезенхимальные стволовые клетки, в том числе на процессы репарации двунитевых разрывов ДНК, пролиферацию, старение, радиационно-индуцированную нестабильность генома и на роль МСК в канцерогенезе.

Обзор написан литературным языком, легко читается, охватывает современные сведения по изучаемым вопросам, полностью вводит читателя в круг анализируемых автором проблем и оставляет самое хорошее впечатление.

В разделе "Материалы и методы исследования" (6 стр.) подробно описаны все использованные автором материалы и все методы, с помощью которых проведено исследование. Все использованные методы адекватны поставленным задачам.

Собственные результаты автора и их обсуждение (64 стр.) изложены в трех разделах.

В первом разделе "Анализ накопления спонтанных ДР ДНК в длительно-культивируемых МСК человека" М.В. Пустовалова приводит данные изучения количества спонтанных фокусов гистона γ H2AX и фокусов фосфорилированной (активной) формы протеинкиназы, мутантной при атаксии-телеангизктазии, - рATM – участвующей в каскаде фосфорилирования белков в ответ на появление ДР в ДНК при действии ионизирующего излучения. Автор, используя МСК человека, полученные из слизистой десны добровольцев, показывает, что при длительном культивировании в изучаемых МСК, на 18 -22 пассажах наблюдается двукратное увеличение фокусов γ H2AX на ядро – с 2 до 5 - и фокусов рATM – с 1 до 2, их колокализация возрастает при анализе по числу фокусов, но снижается при оценке количества фокусов в процентах. Одновременно показано, что число фокусов γ H2AX на поздних пассажах возрастает как в пролиферирующих ($Ki67^+$), так и в покоящихся ($Ki67^-$) клетках. Полученные в этом разделе исследования данные могли дать еще и важную информацию об изменении или постоянстве количества пролиферирующих клеток при длительном культивировании по доле $Ki67^+$ клеток, однако автор такие данные не приводит. На основании полученных в этом разделе работы данных автор приходит к справедливому выводу о том, что МСК на ранних пассажах (3-8) после выделения обладают наиболее оптимальными характеристиками, позволяющими использовать их в экспериментальной работе.

Во втором разделе "Ранние радиационные эффекты " М.А. Пустоваловой описаны следующие исследования, выполненные также на МСК из десны человека.

1. Оценка изменений числа и колокализации фокусов γ H2AX и рATM в ядрах мезенхимальных стволовых клеток, облученных рентгеновским излучением в малых дозах. Автором показана линейная дозовая зависимость как для фокусов γ H2AX, так и для фокусов рATM во всех исследуемых временных точках для изученного диапазона малых и очень низких доз, изучена динамика их снижения, отражающая динамику reparации ДР ДНК. Автором делаются важные заключения о роли ATM в reparации ДР ДНК в разные временные периоды после облучения в разных дозах на основании изучения ко-локализации этих белков в облученных клетках.

2 Сравнительные исследования изменений числа и колокализации фокусов γ H2AX и рATM в ядрах мезенхимальных стволовых клеток, облученных в дозах 80 и 1000 мГр

На основании полученных данных автор убедительно показала, что даже через 24 ч после облучения в дозе 80 мГр в МСК человека, в отличие от дозы 1 Гр, имеет

место сохранение повышенного количества фокусов γ H2AX. Таким образом М.В. Пустовалова убедительно показала, что в МСК десны человека при действии малых доз наблюдается феномен длительного поддержания повышенного количества фокусов γ H2AX. При этом через 24 часа после облучения колокализация γ H2AX и pATM в ядрах не отличалась от контроля после облучения в обеих дозах.

3 Анализ изменения количества фокусов γ H2AX в пролиферирующих и покоящихся клетках.

Автором показано, что в покоящихся - Ki67⁻ клетках уже через 4 часа, а также и через 24 часа после облучения в малой дозе (80 мГр) абсолютное количество фокусов γ H2AX достоверно не отличалось от контрольных значений. В тоже время в пролиферирующих Ki67⁺ МСК и через 4 часа, и через 24 часа после облучения в малой дозе абсолютное количество фокусов γ H2AX достоверно превышало контроль. Длительное существование таких «остаточных» фокусов γ H2AX авторы справедливо связывают особенности формирования и сохранения фокусов с процессом репликации в пролиферирующих клетках.

Третий раздел "Отдаленные эффекты облучения" посвящен исследованию следующих трех вопросов.

1. Качественный анализ фокусов γ H2AX в потомстве облученных клеток.

В этом разделе М.А. Пустоваловой показано, что облучение в малой дозе (80 мГр), в отличие от облучения в дозе 1 Гр, не приводит к достоверному увеличению количества фокусов γ H2AX в потомках облученных клеток на поздних (8 и 11) пассажах.

2. Оценка пролиферативной активности в потомстве облученных клеток.

Автором показано, что при длительном культивировании в контрольных МСК человека происходит статистически достоверное снижение доли пролиферирующих Ki67⁺-клеток, в потомках клеток, облученных в дозе 1 Гр при этом наблюдали более глубокое снижение доли пролиферирующих клеток, в то время как в потомках клеток, облученных в дозе 80 мГр, не отмечалось достоверных изменений пролиферативной активности.

3.Оценка клеточного старения в потомстве облученных клеток.

В этом разделе в экспериментах на МСК из костного мозга человека автором показано увеличение количества стареющих клеток при длительном культивировании (2,5 месяца) контрольных клеток и более высокое увеличение количества стареющих МСК человека после облучения в дозе 1 Гр. Старение МСК в отдаленный период после облучения в дозе 80 мГр не отличалось от старения

контрольных культур.

Все результаты исследований подробно описаны и иллюстрированы 13 рисунками.

Полученные результаты обсуждаются автором частично в соответствующих разделах и, кроме того, более подробно, в главе «Заключение» (4,5 стр.).

Все пять выводов диссертационной работы логично вытекают из полученных данных и полностью соответствуют представленным результатам.

Список литературы содержит ссылки на 212 публикаций.

Замечания по работе.

1. Обзор литературы содержит ссылки практически на все собственные работы автора, представленные далее в диссертационном исследовании, хотя задачей обзора является осветить уже имеющуюся информацию по проблеме, чтобы аргументировать актуальность планируемого исследования.

2. Ссылка на работу Abreu S. C. в подписи к рис. 1.5 не соответствует рисунку.

3. В разделе "Материалы и методы исследования" встречаются некорректные выражения: «от фермента избавлялись» вместо фермент инактивировали; «культивирование МСК проводили в условиях ...абсолютной влажности ...», вместо «при относительной влажности 95%».

4. После знакомства с обзором и результатами работы остается вопрос о том, в какой мере снижение колокализации фокусов гистона γ H2AX и фосфорилированной протеинкиназы ATM (или других протеинкиназ) отражает неучастие той или иной киназы в фосфорилировании γ H2AX? Не может ли снижение колокализации фокусов гистона γ H2AX и фосфорилированной протеинкиназы ATM быть связано с активным фосфорилированием гистона при небольшом количестве молекул фермента в зоне фосфорилирования, недостаточном для его визуализации в виде фокуса?

Анализ диссертационного исследования М.В. Пустоваловой позволяет заключить, что оно является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, в которой получены новые важные данные об особенностях влияния малых доз рентгеновского излучения на культивируемые МСК человека.

Сделанные замечания не носят принципиального характера.

Материалы диссертационной работы представлены в печати в виде 1 статьи в ведущем для этой области исследований отечественном рецензируемом журнале, 3

статьях в высокорейтинговых иностранных журналах и в виде тезисов 7 докладов, представленных на российских и международных конференциях и опубликованных в соответствующих сборниках.

Все сказанное выше позволяет заключить, что диссертационная работа М.В. Пустоваловой "Ранние и отдаленные эффекты воздействия рентгеновского излучения в малых дозах в мезенхимальных стволовых клетках человека" соответствует всем требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ 24 сентября 2013 г., №842), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – радиобиология.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории клеточной биологии
и молекулярной медицины
НИЦ Курчатовский институт
профессор, доктор биологических наук

Елизавета Юрьевна Москаleva

« 04 » сентября 2018 г.

123182, Россия, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1, e-mail: nrcki@nrcki.ru
Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный
исследовательский центр «Курчатовский институт»

Телефон: +7(499)1967306
e-mail: moskalevaey@mail.ru

Подпись Москалевой Е.Ю. заверяю

Директор-координатор по направлению
природоподобные технологии
НИЦ Курчатовский институт

В.А. Демин

