

“УТВЕРЖДАЮ”

Зам. директора по научной работе
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт общей генетики
им. Н. И. Вавилова РАН, к.б.н. С.А. Брускин



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН о научно-практической ценности диссертации Пустоваловой Маргариты Витальевны на тему «Ранние и отдаленные эффекты воздействия рентгеновского излучения в малых дозах в мезенхимальных стволовых клетках человека» на соискание ученой степени кандидата на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – Радиобиология

Актуальность темы диссертационного исследования.

Представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук диссертация посвящена исследованию актуальной проблемы – молекулярным механизмам формирования эффектов облучения в малых дозах (10-100 мГр) в мультипотентных мезенхимальных стволовых клетках (МСК). Важность анализа МСК связана с высоким пролиферативным потенциалом этих клеток и возможностью накопления нарушений и мутаций с последующей передачей дифференцированным клеточным потомкам. Имеющиеся данные о влиянии ионизирующих излучений (ИИ) на МСК достаточно противоречивы: от индукции клеточного старения до стимуляции пролиферации посредством активации MAPK/ERK сигнальных путей. В этой связи очевидна необходимость сравнительно изучения динамики накопления и reparации двунитевых разрывов (ДР) ДНК после воздействия ИИ и в необлученной клеточной культуре. Результаты таких исследований чрезвычайно важны для адекватной оценки опасности облучения в малых дозах, а также для понимания биологических

ВХОД №	1078
ДАТА	06.09.2018
КОЛ-ВО ЛИСТОВ:	7
ФГБУ ГНЦ ФМБи им. А.И. Бурназяна ФМБА России	

процессов, происходящих в длительно-культивируемых МСК. Эти данные могут быть непосредственно использованы в клинической практике для оптимизации протоколов экспансии стволовых клеток, необходимых для клеточной терапии.

Научная новизна и практическая значимость.

В диссертации впервые проведён тщательный анализ динамики накопления и репарации ДР ДНК при воздействии ИИ, обнаруживаемых с помощью анализа фосфорилированного корового гистона H2AX (фокусы γ H2AX). Впервые были получены оригинальные данные о характере изменений количества и колокализации фокусов γ H2AX и фокусов активной, фосфорилированной киназы ATM (pATM) в МСК человека, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения в малых (20, 40, 80 мГр) и средних дозах (160, 250 и 1000 мГр) в ранние временные сроки после облучения (0,5 ч, 4 ч, 24 ч).

Впервые проведена дифференцированная оценка количества фокусов γ H2AX в пролиферирующих и покоящихся длительно культурируемых необлученных МСК при использовании маркера клеточной пролиферации - белка Ki67. Впервые на МСК человека была оценена биологическая значимость остаточных фокусов γ H2AX, позволяющая опровергнуть гипотезу, связывающую их повышенное содержание в клетках после облучения в малых дозах с неэффективной репарацией или индуцибельным характером репарации ДР ДНК. Было показано, что этот феномен обусловлен образованием новых фокусов γ H2AX в результате репликативного стресса, вызванного стимуляцией клеточной пролиферации.

Результаты исследований, полученные на клетках, культурируемых вплоть до 11 пассажа после облучения, свидетельствуют о том, что облучение МСК человека в малых дозах не приводит к эффектам, связанным с преждевременным старением и нестабильностью генома.

Исследование эффектов воздействия ИИ на МСК может вносит вклад в понимание биологических процессов, происходящих в этих клетках в ответ на облучение, и помогает оценить эффекты малых доз облучения, в том числе и при прохождении медицинских диагностических процедур.

Достоверность полученных результатов

Работа выполнена на современном методическом уровне. Обзор литературы, постановка цели и задач исследования, проведение и обсуждение результатов свидетельствуют о хорошей теоретической и методической подготовленности диссертанта. Выводы, сформулированных в диссертации, обеспечиваются качественным анализом научной литературы по изучаемой проблематике, применением адекватных статистических методов обработки данных.

Все описанные эффекты характеризуются высокой статистической значимостью.

Основные положения исследования доложены на Международных конгрессах и конференциях высокого уровня. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 3 статьи в престижных зарубежных изданиях с высоким импакт-фактором (4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России). Автореферат и печатные работы полностью соответствуют материалам диссертации.

Таким образом, полученные М.В. Пустоваловой научные результаты и выводы являются обоснованными и достоверными.

Структура диссертации

Диссертация включается в себя введение, три главы, заключение, выводы, приложение и библиографический список литературы, состоящий из 212 источников (199 на иностранных языках). Основной текст диссертации изложен на 122 страницах, сопровождается 18 рисунками.

Во **введении** раскрыта актуальность темы исследования, определены цели и задачи исследования, сформулированы основные положения, обладающие научной новизной и выносимые на защиту.

Первая глава диссертации посвящена обзору литературы, в котором рассматриваются основные характеристики МСК человека, области их применения в клеточной терапии, роль и место ДР среди повреждений ДНК, основные механизмы репарации ДР ДНК и особенности воздействия ИИ в малых дозах на МСК. Обзор литературы (33 стр.) затрагивает все ключевые работы по

тематике исследований, хорошо читается и представляет самостоятельный интерес для широкого круга радиобиологов, врачей и генетиков.

Во второй главе перечислены экспериментальные методы и схемы исследований, направленные на решение задач диссертационной работы. В главе подробно описываются методы выделения и культивирования МСК, условия облучения, а также использованные иммуноцитохимические методы.

Основные экспериментальные результаты и их обсуждение представлены в третьей главе. Приводятся данные по накоплению спонтанных ДР ДНК в длительно-культивируемых МСК человека, а также при воздействии рентгеновского излучения в малых и больших дозах (1 Гр). Проводится сравнительный анализ изменения числа фокусов γ H2AX в пролиферирующих и покоящихся клетках, изучаются отдаленные эффекты облучения. Даётся оценка пролиферативной активности в потомстве облученных клеток и оценка клеточного старения в потомстве облученных клеток.

Сделанные выводы полностью соответствуют результатам исследования и безусловно впечатляют новизной и определенностью формулировок.

Замечания

Принципиальных замечаний к работе нет. Работа написана предельно ясно и хорошо иллюстрирована. Имеются несколько замечаний редакционного характера.

1. Описывая дозовые зависимости выхода числа фокусов (стр. 58 и далее), автор приводит коэффициенты корреляции (r) и коэффициенты детерминации (R^2), как будто речь идет о каких-то независимых показателях. В этом нет большого смысла, поскольку в случае одномерного регрессионного анализа $R^2 = r^2$. В многомерном случае это, вообще говоря, не так.

2. На рис 3.5 в случае контроля подпись по оси X имеет вид «Время после облучения, мин», что заставляет читателя подозревать, что контроль тоже как-то облучался.

3. Раздел 3.2.1 озаглавлен как «Оценка изменений числа фокусов ... в МСК, облученных рентгеновским излучением в малых дозах». При этом дозовые

зависимости снимаются для диапазона 0-250 мГр, который существенно перекрывает общепринятый диапазон «малых доз».

4. И еще одно, достаточно традиционное замечание. Большинство приведенных автором корреляций «доза-эффект» неприлично высоки (0.95 – 0.99). По-видимому, это связано с тем, что автор, вычисляя коэффициенты корреляций, использовала средние показатели, полученные для каждой дозы. Более правильно было бы использовать все изученные точки (для каждой дозы было 3 повтора). Коэффициенты корреляции в этом случае уменьшатся, но значимость, возможно, возрастет, поскольку точек будет в 3 раза больше.

Приведенные замечания не влияют на, безусловно, высокую оценку диссертационной работы и полученных в ней результатов.

Заключение

Диссертационная работа Пустоваловой Маргариты Витальевны на тему «Ранние и отдаленные эффекты воздействия рентгеновского излучения в малых дозах в мезенхимальных стволовых клетках человека» на соискание ученой степени кандидата является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора биологических наук, профессора РАН Осипова А.Н., содержащей новое решение актуальной научной задачи – изучение механизмов формирования эффектов облучения в малых дозах в мультипотентных мезенхимальных стволовых клетках, имеющей существенное значение для специальности 03.01.01 – радиобиологии. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Пустоваловой Маргариты Витальевны соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, ее автор – Пустовалова Маргарита Витальевна – заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – Радиобиология.

Зав. лаб. экологической генетики ФГБУН ИОГен РАН

Доктор биологических наук

Рубанович Александр Владимирович

Отзыв утвержден на межлабораторном семинаре «Мутагенез и генетическая безопасность» ИОГен РАН 31.08.18 (протокол № 51).

Рук. семинара зам. директора ФГБУН ИОГен РАН

Доктор биологических наук, профессор

Абилев Серикбай Каримович

Подпись А.В. Рубановича заверяю:

ученый секретарь ФГБУН ИОГен РАН

доктор биол. наук

«30» августа 2018 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

119991, Москва, ГСП-1, ул. Губкина, 3

Тел.: 499 135-62-13, E-mail: iogen@vigg.ru



Старкова Ольга Александровна

Избранные работы сотрудников Института за последние 5 лет по теме, соответствующей данной диссертации

1. Nina S. Kuzmina, Nellya Sh. Lapteva, Galina G. Rusinova, Tamara V. Azizova, Natalya S. Vyazovskaya, Alexander B. Rubanovich, Gene hypermethylation in blood leukocytes in humans long term after radiation exposure – validation set. Environmental Pollution. 2018. V.234. P. 935-942.
2. Alyaksandr V. Nikitski, Tatiana I. Rogounovitch, Andrey Bychkov, Meiko Takahashi, Kohichiro Yoshiura, Norisato Mitsutake, Takahisa Kawaguchi, Michiko Matsuse, Valentina M. Drozd, Yuri Demidchik, Eijun Nishihara, Mitsuyoshi Hirokawa, Akira Miyauchi, Alexander V. Rubanovich, Fumihiko Matsuda, Shunichi Yamashita, and Vladimir A. Saenko. Genotype Analyses in the

Japanese and Belarusian Populations Reveal Independent Effects of rs965513 and rs1867277 but Do Not Support the Role of FOXE1 Polyalanine Tract Length in Conferring Risk for Papillary Thyroid Carcinoma // Thyroid, 2017 v. 27(2), pp. 224-235.

3. Кузьмина Н.С., Лаптева Н.Ш., Русинова Г.Г., Азизова Т.В., Вязовская Н.С., Рубанович А.В. Гиперметилирование промоторов генов в лейкоцитах крови человека в отдаленный период после перенесенного радиационного воздействия. Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. Т.57. № 4. С. 341 – 356.
4. Nina S. Kuzmina, Nellya Sh. Lapteva, Alexander V. Rubanovich. Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure // Environmental Research. 2016. 146, p.10–17.
5. A.V. Rubanovich, N. N. Khromov-Borisov. Genetic risk assessment of the joint effect of several genes: Critical appraisal. Russian Journal of Genetics. July 2016. V. 52. Issue 7, P. 757–769.
6. Kuzmina N.S., Myazin A.E., Lapteva N.S., Rubanovich A.B. The study of hypermethylation in blood leukocytes of irradiated parents and their children. // Central European Journal of Biology. 2014. V. 9. № 10. P. 941-950.
7. Л.Е. Сальникова, А.Г. Чумаченко, О.Б. Белопольская, А.В. Рубанович. Генетические и цитогенетические предикторы радиочувствительности хромосом человека // Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53. № 3. С. 259–266.

Список работ сотрудников Института теме, диссертации заверяю:

ученый секретарь ФГБУН ИОГен РАН

доктор биол. наук



Огаркова Ольга Александровна