

## ОТЗЫВ

### официального оппонента на диссертационную работу

Греховой Анны Константиновны "Особенности образования и репарации двунитевых разрывов ДНК в фибробластах кожи человека, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения в малых и средних дозах", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – радиобиология в диссертационный совет Д 462.001.04 при ФГБУ "Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Буриазяна" ФМБА России.

#### Актуальность темы исследования.

Проблема биологических эффектов малых доз ионизирующей радиации является в настоящее время одной из центральных и очень важна для медико-экологического мониторинга и оценки риска радиационного воздействия. Последнее десятилетие ознаменовалось резким увеличением вклада облучения от медицинских диагностических процедур с использованием радиологических методов. Если при проведении диагностического исследования традиционным методом рентгенографии доза облучения обычно находится в пределах до 1,2 мЗв, то при использовании компьютерной томографии доза возрастает до 31 мЗв. Лучевая терапия злокачественных новообразований может сопровождаться получением малых и средних доз излучения клетками нормальных тканей, окружающих опухоль.

Вопрос о влиянии малых доз облучения до настоящего времени остается дискуссионным. Классическая радиобиология, не может объяснить целый ряд феноменов, при действии малых доз радиации, так как она в основном базировалась на данных, полученных при остром облучении биологических объектов в больших дозах.

Действие ионизирующего излучения (ИИ) проявляется на всех уровнях организации и вызывает формирование ряда специфичных ответных реакций. ИИ индуцирует целый ряд повреждений ДНК, включая одно- и двунитевые разрывы, повреждения азотистых оснований и сахаро-фосфатного остова молекулы. Двунитевые разрывы ДНК являются основным триггером, определяющим дальнейшую судьбу клетки, поскольку от их количества и эффективности репарации напрямую зависит ответ клеток на действие ионизирующей радиации.

Таким образом, тема диссертационного исследования Греховой А.К., посвященного изучению закономерностей образования двунитевых разрывов ДНК и их репарации, индуцированных малыми и средними дозами рентгеновского излучения в фибробластах кожи человека *in vitro*, безусловно является актуальной как с научной, так и с практической точки зрения.

ВХОД №	64
ДАТА	17.01.19
КОЛ-ВО ЛИСТОВ:	4
ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Буриазяна ФМБА России	

## **Структура и основное содержание работы.**

Диссертационная работа А.К. Грековой построена по классическому принципу и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, описание результатов исследования и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, содержащий 147 источников. Диссертация изложена на 111 страницах текста и проиллюстрирована 29 рисунками.

Обзор литературы занимает 21 страницу и представлен четырьмя разделами. В первых двух разделах автор характеризует гистон H2AX с акцентом на его фосфорилирование в ответ на образование двунитевых разрывов ДНК. В третьем разделе описаны механизмы reparации двунитевых разрывов ДНК и особенности пострадиационной активации протеинкиназ, фосфорилирующих гистон H2AX. В четвертом разделе обсуждается проблема "остаточных фокусов".

Обзор охватывает современные сведения по изучаемым вопросам, вводит читателя в круг анализируемых автором проблем и оставляет хорошее впечатление.

В главе "Материалы и методы" (8 стр.) подробно описаны все использованные автором материалы и все методы, с помощью которых проводилось исследование. Все использованные методы полностью адекватны поставленным задачам.

Собственные результаты автора и их обсуждение (40 страниц) изложены в соответствующей главе. Автором были выделены и охарактеризованы фибробlastы кожи человека. Получены дозовые и временные зависимости количества фокусов  $\gamma$ H2AX от дозы рентгеновского излучения (20 мГр – 1 Гр) и времени инкубации клеток после облучения (0,25-24 ч). Изучено формирование фокусов маркера двунитевых разрывов ДНК фосфорилированного гистона H2AX ( $\gamma$ H2AX) в пролиферирующих (положительных по маркеру пролиферации Ki67) и покоящихся (отрицательных по Ki67) клетках. Установлено, что как в контрольных, так и в облученных в дозах 80 и 250 мГр Ki67<sup>+</sup> клетках количество фокусов  $\gamma$ H2AX было выше по сравнению с Ki67<sup>-</sup> клетками. Далее, автор исследовал влияние фаз клеточного цикла на формирование фокусов  $\gamma$ H2AX. Обнаружено, что как в контрольных, так и в облученных клетках через 0,5 ч после облучения количество фокусов  $\gamma$ H2AX в ядрах клеток, находящихся в фазах S/G2 клеточного цикла (CENPF<sup>+</sup>), в несколько раз превышало количество фокусов в клетках, находящихся в G0/G1 (CENPF<sup>-</sup>). К сожалению, из текста диссертации не ясно, какая доля клеток приходится на указанные выше фазы клеточного цикла. Есть данные только через 24 ч после облучения. Судя по приведенным микрофотографиям клеток, различалось не только количество фокусов  $\gamma$ H2AX, но и их размер: в CENPF<sup>+</sup> клетках фокусы крупные, в то время как в CENPF<sup>-</sup> клетках значительно меньше по размеру.

В следующем разделе приведены результаты исследования репарации двунитевых разрывов ДНК. Продемонстрировано, что после облучения клеток в средних дозах (160-1000 мГр) максимальное количество фокусов  $\gamma$ H2AX наблюдалось через 0,5 ч, далее число фокусов снижалось по экспоненте в течение 24 ч до контрольного уровня. После облучения же клеток малыми дозами ИИ (20-80 мГр) максимальное количество фокусов  $\gamma$ H2AX наблюдалось также через 0,5 ч после облучения, практически не изменялось в течение 2 ч, затем постепенно снижалось. Автор выделил 2 фазы снижения количества фокусов: быструю (0,5 ч - 4-6 ч) и медленную (4-6 ч - 24 ч).

Выявлено, что в клетках, облученных малыми дозами ИИ (40-80 мГр), количество "остаточных" фокусов  $\gamma$ H2AX (фокусов, регистрируемых через 24 ч после облучения) было выше, чем в контрольных клетках и в клетках, облученных средними дозами. Автор предположил, что длительное поддержание повышенного количества фокусов  $\gamma$ H2AX после облучения в малых дозах может быть либо результатом замедления репарации двунитевых разрывов ДНК, либо появлением новых фокусов  $\gamma$ H2AX.

На следующем этапе было оценено количество и колокализация фокусов  $\gamma$ H2AX и рАТМ (fosфорилированной протеинкиназы, мутантной при атаксии-телеангизктазии). ATM является одной из основных протеинкиназ, fosфорилирующих гистон H2AX в ответ на образование двунитевых разрывов ДНК, индуцированных ИИ. Автором показана линейная дозовая зависимость для фокусов  $\gamma$ H2AX, рАТМ и их колокализации во всех исследованных временных точках. Обнаружены различия в количестве фокусов рАТМ после облучения клеток малыми и средними дозами. Максимальные количества фокусов рАТМ появляются в разное время: через 5-15 мин после воздействия средних доз и через 2 ч после облучения в малых дозах. Характер fosфорилирования гистона H2AX киназой ATM зависит от дозы облучения.

Были обнаружены различия в динамике fosфорилирования гистона H2AX киназой ATM при облучении фибробластов в малых и средних дозах ИИ. Анализируя колокализацию фокусов  $\gamma$ H2AX и рАТМ автор делает вывод об ATM-независимом характере fosфорилирования H2AX в первые 30 мин после облучения и о начале ATM-зависимого fosфорилирования H2AX через 8 ч после облучения.

Далее А.К. Грехова исследовала влияние дозы ИИ на размер фокусов  $\gamma$ H2AX и рАТМ через 0,5 и 24 ч после облучения. При облучении фибробластов в дозах 160-1000 мГр через 24 ч инкубации регистрировалось статистически значимое увеличение размеров фокусов  $\gamma$ H2AX и рАТМ. В ядрах клеток, облученных в дозах 20 и 40 мГр, с увеличением времени инкубации размер фокусов белков репарации не увеличивался. Интересно, что в клетках, облученных в дозе 80 мГр (близкой к пограничной дозе 100 мГр между

диапазонами малых и средних доз), через 24 ч инкубации размеры фокусов pATM также увеличивались, в то время как размеры фокусов  $\gamma$ H2AX практически не изменялись.

Оценивая вклад гомологичной рекомбинации в репарацию двунитевых разрывов ДНК после облучения фибробластов человека в малых и средних дозах А.К. Грехова показала, что количество фокусов основного белка гомологичной рекомбинации Rad51 после рентгеновского облучения в малых и средних дозах изменяется синхронно: достоверное увеличение количества фокусов регистрируется через 2 ч после облучения, а максимальное количество выявляется через 6 ч. Анализ количества фокусов Rad51 позволил выявить, что именно гомологичная рекомбинация вызывает повышенный уровень фокусов  $\gamma$ H2AX и pATM через 24 ч после облучения клеток. Полученные данные свидетельствуют о более корректной репарации "остаточных" повреждений ДНК после облучения клеток малыми дозами ИИ.

Следующий раздел посвящен анализу влияния статуса клеток (пролиферативной) и фаз клеточного цикла на динамику репарации двунитевых разрывов. Продемонстрировано, что количество фокусов  $\gamma$ H2AX в ядрах пролиферирующих клеток, и, в особенности, в S/G2 фазах клеточного цикла достоверно превышало таковое в ядрах клеток в G0/G1 фазах цикла. Количество фокусов  $\gamma$ H2AX в клетках, облученных в дозах 250 и 1000 мГр, с увеличением времени инкубации пропорционально снижалось как в CENPF<sup>+</sup>, так и в CENPF<sup>-</sup> клетках. В клетках, облученных ИИ в дозе 80 мГр, динамика была иной. Количество фокусов  $\gamma$ H2AX в CENPF<sup>+</sup> клетках во всех исследуемых временных точках (за исключением 8 ч) не отличалось от количества фокусов в контроле. В CENPF<sup>-</sup> клетках количество фокусов  $\gamma$ H2AX повышалось через 0.5 ч инкубации, сохранялось на том же уровне через 2 ч; через 4 ч наблюдалось снижение и к 24 ч количество фокусов снижалось до уровня контроля. На основании полученных экспериментальных данных автор делает вывод, что изменение доли клеток в S/G2 фазах является критическим и влияет на корректность подсчета среднего количества фокусов  $\gamma$ H2AX в несинхронизированных клеточных популяциях.

Аналогичным образом была изучена динамика изменения количества фокусов pATM. Максимальные различия между количеством фокусов pATM в CENPF<sup>+</sup> и в CENPF<sup>-</sup> клетках обнаружены во время медленной фазы репарации (4-8 ч).

Результаты исследований подробно описаны и иллюстрированы 24 рисунками.

В "Заключении" автор подводит итоги исследования, обобщая полученные результаты. Все пять выводов диссертационной работы логично вытекают из полученных данных, адекватны и обоснованы.

**Обоснованность и достоверность научных положений и выводов.**

Научные положения и выводы диссертационной работы А.К. Греховой базируются на обширном экспериментальном материале. Работа выполнена на хорошем научно-методическом уровне с использованием современных методов, достоверность результатов благодаря соблюдению требований статистики при проведении экспериментов и статистической обработке полученных результатов не вызывает сомнений.

**Научная новизна результатов исследования, их теоретическая и практическая значимость.**

Автором впервые установлено, что абсолютное и относительное количество фокусов γH2AX, pATM и Rad51 в клетках фибробластов, выделенных из кожи здоровых добровольцев, через 24 ч после облучения рентгеновскими лучами в малых дозах (20 – 80 мГр) было выше, чем после аналогичного воздействия средними дозами (160 – 1000 мГр). Впервые продемонстрировано, что повышенное, по сравнению с контролем, количество фокусов белков репарации через 24 ч после облучения фибробластов ИИ в малых дозах связано с образованием этих белков *de novo* в результате стимуляции пролиферативной активности фибробластов. Впервые показано, что репарация двунитевых разрывов ДНК, индуцированных облучением в малых дозах, идет более эффективно и корректно.

Результаты диссертационного исследования А.К. Греховой представляют не только теоретический, но и практический интерес для дальнейшего развития представлений о воздействии малых доз ИИ на процессы репарации двунитевых разрывов ДНК.

Результаты работы отражены в четырех статьях в рецензируемых журналах, три из которых включены в Перечень ВАК РФ, четвертая статья опубликована в зарубежном журнале, индексируемом в базах данных Web of Science и Scopus, а также были представлены в виде докладов на 7 международных и отечественных конференциях и опубликованы в соответствующих сборниках.

**Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации.**

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями, предъявляемыми к авторефератам, дает полное представление об основных положениях диссертации и соответствует ее содержанию.

**Замечания по содержанию и оформлению диссертационной работы.**

Принципиальных замечаний к диссертационной работе Греховой А.К. нет.

Замечания не принципиального характера:

1. Не представлены данные фенотипирования выделенных фибробластов человека. Так как в работе использовали культуры клеток, выделенные из кожи разных доноров, необходимо было представить хотя бы некоторые характеристики этих клеток. Также в

тексте диссертации не указано, использовали ли в той или иной серии экспериментов клетки, полученные от одного или от разных доноров.

2. Некоторые неудачные формулировки и несогласование слов в предложениях (например, "Пострадиационное восстановление структуры ДНК от двунитевых разрывов", "Контролируемая дифференцировка клеточного цикла" или "В этой связи, провели анализ распределения фибробластов по количеству фокусов γH2AX в несинхронизированных, CENPF+ и CENPF- клетках через 24 ч после облучения в дозе 80 мГр, по сравнению с дозами 250 и 1000 мГр" и др.) затрудняют чтение и понимание текста диссертации.
3. Для подтверждения одного из основных выводов диссертационной работы (вывод 4) все-таки необходимо было проанализировать клеточный цикл облученных и контрольных клеток не только через 24 ч после облучения, но и на более ранних сроках (4, 8, 12-16, 18 ч). Также желательно было бы привлечь и альтернативный метод анализа клеточного цикла, например, метод проточной цитометрии.

В порядке обсуждения полученных результатов хотелось бы получить ответы на следующие вопросы:

1. Как можно объяснить различие экспериментальных данных, представленных в разделах 3.2 и 3.4 и на рисунках 16, 25 и 26? Речь идет о подсчете фокусов γH2AX через 24 ч после облучения клеток в дозе 80 мГр. В разделе 3.2 автор пишет о достоверном различии в количестве фокусов в ядрах облученных и контрольных клеток (рисунок 16). Однако, на рисунке 25 хорошо видно, что разница отсутствует. Возможно, это несоответствие связано с тем, что в разных сериях экспериментов использовали клетки разных доноров, и наличие или отсутствие "остаточных фокусов" связано с возрастными или индивидуальными отличиями доноров по чувствительности к облучению?
2. Исходя из того обстоятельства, что фокусы рАТМ появляются в облученных клетках позднее, чем фокусы γH2AX, автор делает вывод об АТМ-независимом фосфорилировании H2AX. Однако, если вспомнить о том, что АТМ – это фермент, который способен фосфорилировать не одну, а, как минимум, несколько десятков молекул субстрата (в данном случае H2AX), то не может ли объясняться отсутствие фокусов рАТМ наличием в участке двунитевых разрывов ДНК недостаточного количества молекул фермента для его регистрации с использованием флуоресцентного микроскопа?

#### **Заключение.**

Диссертационная работа Греховой Анны Константиновны "Особенности образования и reparации двунитевых разрывов ДНК в фибробластах кожи человека, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения в малых и средних дозах" является

цельной, законченной научно-квалификационной работой, результаты и выводы которой вносят существенный вклад в радиационную биологию.

По своему содержанию, уровню проведенных исследований, актуальности выбранной темы, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности полученных результатов, их научной и практической значимости диссертационная работа Греховой Аины Константиновны соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 с внесенными изменениями от 30.06.2014 №72, 21.04.2016 №335, 02.08.2016 №748, 29.05.2017 №650, 28.08.2017 №1024 и 01.10.2018 №1168, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Грехова Аина Константиновна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – радиобиология.

Официальный оппонент:  
доктор биологических наук  
Научная специальность 03.01.04 – Биохимия  
Отрасль наук: биологические.  
Ведущий научный сотрудник  
лаборатории клеточной биологии  
и молекулярной медицины  
Курчатовского комплекса  
НБИКС-природоподобных технологий  
ФГБУ "Национальный исследовательский  
центр "Курчатовский институт"

e-mail: galinapo@gmail.com, Posypanova\_GA@nrcki.ru  
123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1.  
Тел.: +7 (499) 196-7100, доб. 6683; +7 (915) 158-7715.  
«15» января 2019 г.

Посыпанова  
Галина Ароновна

Подпись доктора биологических наук Г.А. Посыпановой заверяю:

Главный ученый секретарь ФГБУ  
"Национальный исследовательский  
центр "Курчатовский институт"  
доктор физико-математических наук

Форш Павел Анатольевич

