

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель генерального
директора ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им.
А.И. Бурназяна ФМБА России

д.м.н., профессор

Бунтманов А.Ю.

2023 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна»

Диссертация Абдуллаева Серажутдина Абдуллаевича на тему «Пострадиационные механизмы функционирования и стабилизации митохондриального генома» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.1. – Радиобиология выполнена на базе Отдела экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» и Лаборатории радиационной молекулярной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук.

В период подготовки диссертации Абдуллаев С.А. с 2006 года работал в Лаборатории радиационной молекулярной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук сначала в должности младшего научного сотрудника, по настоящее время в должности – старшего научного сотрудника (по совместительству); с 2022 года по настоящее время в должности заведующего лабораторией молекулярной биологии и генетики радиационных эффектов отдела Экспериментальной радиобиологии и

радиационной медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна».

В 2005 году Абдуллаев С.А. окончил биологический факультет Дагестанского государственного университета. В 2008 году окончил магистратуру по специальности «Биофизика», факультет биофизики и биомедицины в Путинском государственном университете.

В 2010 году досрочно окончил аспирантуру и в этом же году защитил кандидатскую диссертацию по специальности 03.00.01 – Радиобиология.

Тема докторской диссертации утверждена на заседании секции № 1 Ученого Совета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России (протокол № 4 от 09 июня 2022 г.).

Научные консультанты:

Осипов Андреян Николаевич – доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий Отделом экспериментальной биологии и радиационной медицины ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

Газисев Ажуб Ибрагимович – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник ИТЭБ РАН.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Актуальность темы исследования

Исследование структурно-функциональных нарушений генома в клетках человека и животных, подвергнутых воздействию ионизирующих излучений (ИИ), в настоящее время остается актуальным. Основополагающие исследования по данной проблеме проводятся, ориентируясь на важнейшую мишень радиационного поражения – ядерную ДНК (ядНК). Однако известно, что в клетках млекопитающих кроме ядНК содержится и множество копий митохондриальной ДНК (мтДНК). В настоящее время ряд авторов считают, что мтДНК является более уязвимой мишенью клетки, по сравнению с ядНК, для эндогенных и экзогенных повреждающих агентов.

МтДНК в структурной организации и функционировании имеет ряд особенностей, отличных от ядНК. Так, мтДНК содержит гены, кодирующие белки системы дыхательной цепи. Для нее характерна повышенная мутабильность,

благодаря повреждениям, индуцируемым активными формами кислорода (АФК), генерируемыми в самих митохондриях, и ошибками репликативного синтеза. В тканях (в том числе в постmitотических тканях мозга, сердца, скелетных мышц) мтДНК может реплицироваться независимо от клеточного цикла в течение всей жизни организма. Результаты многих исследований показывают, что при воздействии на клетки ИИ или химических мутагенов в мтДНК возникает в 3-50 раз больше повреждений, чем в соразмерном фрагменте яДНК. Процессы reparации ДНК в митохондриях клеток функционируют менее эффективно, чем в яДНК. Если репликация поврежденной яДНК блокируется индуцибелльной системой контроля клеточного цикла до завершения ее reparации, то эта система не блокирует репликацию поврежденной мтДНК в митохондриях. Возможно, именно по этим причинам в мтДНК наблюдается накопление мутаций с более высокой частотой, чем в яДНК, с которым связаны клеточная гибель, нестабильность генома.

Вместе с тем, хотя в радиобиологических исследованиях много внимания уделяется радиационному нарушению энергетического метаболизма, сведения по радиационному мутагенезу мтДНК в клетках человека или животных, подвергшихся воздействию ИИ на уровне целого организма, в литературе ограничены и противоречивы.

Стабильность и сохранение митохондриального генома, изменение количества копий мтДНК (дозы генов мтДНК) в клетках играют важную роль в адаптации человека к различным условиям внешней среды. С нарушениями мтДНК ассоциируются широкий спектр заболеваний, ослабление функций тканей, нарушения иммунной системы, развитие опухолевых патологий, старения. Поэтому исследование возникновения, аккумуляции мутантных копий мтДНК и изменения количественного содержания копий мтДНК в клетках тканей организма млекопитающих, подвергнутых воздействию ИИ, представляется актуальным и востребованным.

Научная новизна исследований

Впервые показано, что активность reparации яДНК, синтез мтДНК и уровень ее мутантных копий, а также модуляции экспрессии генов поддержки митохондрий, различны в гиппокампе, коре и мозжечке крыс после их облучения, что связано с

различиями в радиочувствительности. В регионе гиппокампа наблюдался самый высокий уровень мтДНК с мутациями.

Впервые установлено, что в клетках тканей (головной мозг, селезенка) мышей, подвергнутых воздействию разных доз рентгеновского излучения, резко возрастает уровень мутантных копий мтДНК с максимумом на 8-й день после облучения с последующим снижением их содержания к 28-му дню пострадиационного времени. Образование мутантных копий мтДНК в тканях головного мозга и селезенки облученных мышей, как и мутагенез ядерных генов, имеет линейную зависимость от дозы рентгеновского излучения (в пределах 1-5 Гр).

Результаты анализов мутантных копий мтДНК головного мозга и селезенки облученных мышей показывают снижение количества мутантных копий мтДНК в пострадиационный период. В ткани селезенки этот процесс происходит более активно, чем в ткани головного мозга. Вместе с тем, общее количество копий мтДНК в тканях головного мозга и селезенки облученных мышей остается в течение всего пострадиационного времени (8-28 дней) без изменения, хотя и ниже на 25-40% по сравнению с данными контрольной (необлученной) группы (при дозе облучения 5 Гр).

Впервые установлено, что в кровоток облученных мышей в течение пострадиационного времени поступает большое количество циркулирующей вк-мтДНК, существенная часть которой представлена мутантными копиями. Уровень вк-мтДНК с мутациями в плазме крови мышей зависит от дозы их облучения. Динамика изменения общего содержания циркулирующей вк-мтДНК и уровня ее мутантных копий в плазме облученных мышей отличается от таковой в тканях селезенки и мозга этих же животных. Увеличение содержания мутантных копий вк-мтДНК в плазме облученных мышей совпадает со снижением их уровня в тканях этих же животных.

Впервые показана возможность преодоления трансренального (почечного) барьера и перехода в мочу вк-мтДНК, наряду с вк-яДНК, у животных после воздействия рентгеновского излучения, а также после введения блесминцина. Обнаружена дозовая зависимость выявленных эффектов. При этом уровень вк-мтДНК в моче крыс выше по сравнению с таковым яДНК. Определенная доля фрагментов вк-мтДНК мочи облученных крыс содержит мутантные копии.

В работе показано, что последствия радиационного воздействия можно снизить путем введения экзогенного мелатонина до и после радиационного воздействия. Показано, что, хотя ткани селезенки и коры головного мозга мышей отличаются исходными контрольными значениями анализируемых маркеров, антирадиационный потенциал мелатонина успешно реализуется в обеих тканях. Показано, что мелатонин эффективнее проявляет радиозащитные свойства как радиомитигатор.

Показано, что метформин действует как радиомитигаторный эффектор, способствуя активной экскреции вк-мтДНК и вк-ядНК с мочой облученных крыс, тем самым обеспечивая им повышение выживаемости после действия ионизирующей радиации.

Таким образом, полученные результаты являются уникальными и привносят принципиально новые сведения о роли мтДНК в развитии радиационно-индукционного ответа организма на облучение, а также о возможности использования такого критерия как уровень мтДНК в биологических жидкостях в качестве потенциального неинвазивного биомаркера оценки радиационного поражения и воздействия других генотоксических агентов на организм.

Научно-практическая значимость работы

Научно-практическая задача работы заключалась в получении новых данных по формированию радиационного мутагенеза мтДНК и изменению уровней мутантных копий мтДНК в тканях облученных животных в пострадиационный период, которые существенно дополняют знания о механизмах развития лучевой реакции организма. Полученные результаты и использованные методические подходы могут быть применены в дальнейших экспериментальных исследованиях, а также в клинической практике при проведении мониторинга радиотерапии опухолей. Важным результатом, ориентированным на практическое использование, является обнаружение повышенного уровня общего количества фрагментов вк-ядНК и вк-мтДНК, а также увеличения содержания мутантный копий вк-мтДНК в плазме и моче облученных животных. Поскольку мтДНК является более уязвимой мишенью (чем ядНК) для ИИ и других генотоксических агентов, то повышенное содержание вк-мтДНК с мутациями в плазме крови и моче животных после радиационного воздействия и влияния других генотоксикантов можно

рассматривать как потенциальный чувствительный биомаркер для оценки радиационного поражения и наличия генотоксического груза.

Таким образом, практическая значимость данной диссертационной работы определяется возможностью разработки на основе внеклеточных нуклеиновых кислот в биологических жидкостях чувствительной пенивазивной быстрой тест-системы оценки клеточной гибели при действии радиации и других генотоксичных агентов, а также оценки эффективности противолучевых средств. Данная тест-система может быть востребована в учреждениях Федерального Медико-биологического Агентства РФ и в ряде других радиологических и радиобиологических отделах других институтов.

Личное участие автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации

Соискатель выполнял все этапы диссертационного исследования, включая формулирование цели, задач, положений и выводов, планирование и проведение исследований, статистический анализ и интерпретацию полученных экспериментальных данных. Соискателем подготовлены публикации в отечественные и международные профильные журналы, полученные результаты представлены на конференциях регионального, всероссийского и международного уровней. Личный вклад автора в диссертационном исследовании составил не менее 90%.

Степень обоснованности научных положений, выводов, рекомендаций

Диссертационная работа выполнена на современном научном уровне с применением современных методов исследования. Полнота и объем материала в достаточной мере обосновывают выводы, вытекающие из полученных соискателем результатов и отвечающие на поставленные в диссертации задачи. Научные положения и выводы четко обоснованы и логично вытекают из данных, полученных автором. Все полученные результаты соответствуют имеющемуся и полученному соискателем первичному материалу, достоверны и не вызывают сомнений.

Достоверность полученных результатов

Достоверность результатов диссертации обеспечивается проведением большого количества экспериментов с достаточной воспроизводимостью; статистической обработкой полученных данных с заданной вероятностью и

необходимым количеством повторных исследований; определяется применением современных методик, высококачественных расходных материалов и современного оборудования при проведении экспериментов. Экспериментальные данные были проанализированы посредством современных пакетов статистического анализа (программа GraphPad Prism 8.0). Результаты работы были опубликованы в рецензируемых научных отечественных и международных журналах: Биофизика, Биомедицинская Химия, Радиационная биология, Радиоэкология, Медицинская радиология и радиационная безопасность, IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering, Biology Bulletin, Biogerontology, Radiation and Environmental Biophysics, Journal of Circulating Biomarkers, Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, International Journal of Molecular Sciences, Molecular Biology Reports, Antioxidants и др.

Полнота опубликования в печати

По теме диссертации опубликовано 55 печатных работ, в том числе 18 статей в рецензируемых журналах из перечня изданий, рекомендованных ВАК РФ и 37 работ опубликовано в материалах российских и международных конференций, съездов и симпозиумов.

1. Абдуллаев, С.А. Мутантные копии митохондриальной ДНК в тканях и в плазме мышей, подвергнутых воздействию рентгеновским излучением / С.А. Абдуллаев, Е.С. Анищенко, А.И. Газиев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2010. – Т.50. – №3. – С. 318 – 328. (Scopus), 70% участие в публикации.
2. Стрелкова, И.Ю. Доля мутантной внеклеточной митохондриальной ДНК повышается у больных раком легких после радиотерапии / И.Ю. Стрелкова, С.А. Абдуллаев, Г.П. Смагирова, В.Г. Безлепкин, А.И. Газиев // Биомедицинская химия. – 2010. – Т.56. – №4. – С. 517 – 525. (Scopus, WoS), 70% участие в публикации.
3. Абдуллаев, С.А. Экспериментальное выявление интеграции mtДНК в ядерном геноме, инициированной ионизирующими радиацией / С.А. Абдуллаев, Л.А. Фоменко, Е.А. Кузнецова, А.И. Газиев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2013. – Т.53. – №4. – С. 380 – 388. (Scopus), 80% участие в публикации.

4. Abdullaev, S.A. Experimental detection of mitochondrial DNA insertions in nuclear genome of chicken embryos developed from X-ray irradiated eggs / S.A. Abdullaev, A.I. Gaziev // Journal of Genetics and Genome Research. – 2014. 1:008, 80% участие в публикации.
5. Gaziev, A.I. Mitochondrial function and mitochondrial DNA maintenance with advancing age / A.I. Gaziev, S. Abdullaev, A. Podlutsky // Biogerontology. – 2014. – V. 15. – P. 417 – 438. (Scopus, WoS), 50% участие в публикации.
6. Abdullaev, S.A. Cell-free DNA in the urine of rats exposed to ionizing radiation / S.A. Abdullaev, G.M. Minkabirova, V.G. Bezlepkin, A.I. Gaziev // Radiation and Environmental Biophysics. – 2015. – V. 54. – P. 297-304. (Scopus, WoS), 80% участие в публикации.
7. Gaziev, A. X-rays and metformin cause increased urinary excretion of cell-free nuclear and mitochondrial DNA in aged rats / A. Gaziev, S. Abdullaev, G. Minkabirova, K. Kamenskikh // Journal of Circulating Biomarkers. – 2016. – V. 3. P. 1 – 8. (Scopus), 70% участие в публикации.
8. Минкабирова, Г.М. Уровень внеклеточной ядерной и митохондриальной ДНК в моче старых крыс резко возрастает после рентгеновского облучения и введения метформина / Г.М. Минкабирова, С.А. Абдуллаев, К.А. Каменских, А.И. Газиев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2017. – Т.57. – №5. – С. 486 – 494. (Scopus), 70% участие в публикации.
9. Abdullaev, S.A. Metformin prolongs survival rate in mice and causes increased urinary excretion of cell-free DNA in X-irradiated rats / S. Abdullaev, G. Minkabirova, E. Karmanova, V. Bruskov, A. Gaziev // Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2018. – V. 831. – P. 13 – 18. (Scopus, WoS), 80% участие в публикации.
10. Karmanova, E.E. Antioxidant and genoprotective properties of the antidiabetic drug metformin under X-ray irradiation / E.E. Karmanova, S.A. Abdullaev, V.E. Ivanov, G.M. Minkabirova, V.I. Bruskov // IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering. – 2019. – V. 487. 012023. (Scopus, WoS), 50% участие в публикации.
11. Минкабирова, Г.М. Увеличение содержания внеклеточной ядерной и митохондриальной ДНК в моче крыс после рентгеновского облучения или

- введения блоками / Г.М. Минкабирова, С.А. Абдуллаев // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2019. – Т.64. – №5. – Р. 5 – 8. (Scopus), 90% участие в публикации.
12. Абдуллаев, С.А. Исследование количества копий и гетероплазмии митохондриальной ДНК в различных областях головного мозга крыс после крациального облучения протонов / С.А. Абдуллаев, Э.В. Евдокимовский, А.И. Газиев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2020. – Т.60. – №1. С. 5 – 11. (Scopus), 80% участие в публикации.
13. Abdullaev, S.A. A study of mitochondrial DNA copy number and heteroplasmy in different rat brain regions after cranial proton impact / S.A. Abdullaev, E.V. Evdokimovskii, A.I. Gaziev // Biology Bulletin. – 2020. – V. 47. – №11. – P. 1489 – 1494. (Scopus, WoS), 80% участие в публикации.
14. Abdullaev, S. Assessment of nuclear and mitochondrial DNA, expression of mitochondria-related genes in different brain regions in rats after whole-body X-ray irradiation / S. Abdullaev, N. Gubina, T. Bulanova, A. Gaziev // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Т. 21. – №4. 1196. (Scopus, WoS), 80% участие в публикации.
15. Abdullaev, S. Increase of mtDNA number and its mutant copies in rat brain after exposure to 150 MeV protons / S. Abdullaev, T. Bulanova, G. Timoshenko, A.I. Gaziev // Molecular Biology Reports. – 2020. – Т. 47. – Р. 4815 – 4820. (Scopus, WoS), 70% участие в публикации.
16. Abdullaev, S. Radioprotective and radiomitigative effects of melatonin in tissues with different proliferative activity / S.A. Abdullaev, S.I. Glukhov, A.I. Gaziev // Antioxidants. – 2021. – Т.10. 1885. (Scopus, WoS), 80% участие в публикации.
17. Абдуллаев С.А. Мелатонин снижает радиационные повреждения слизезепти и увеличивает выживаемость при его введении до и после воздействия на мышей рентгеновского излучения / С.А. Абдуллаев, С.И. Глухов, А.И. Газиев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2022. – Т.62. – №5. – С. 523 – 531. (Scopus), 80% участие в публикации.
18. Mishukov, A. ONC201-induced mitochondrial dysfunction, senescence-like phenotype and sensitization of cultured BT474 human breast cancer cells to TRAI / A. Mishukov, I. Odinokova, E. Mndlyan, M. Kobyakova, S. Abdullaev, V.

Zhalimov, X. Glukhova, V. Galat, Y. Galat, A. Senotov, R. Fadeev, A. Artykov, M. Gasparian, M. Solovieva, I. Beletsky, E. Holmuhamedov. // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Т. 23. – № 24. 15551. (Scopus, WoS), 30% участия в публикации.

В сборниках тезисов российских и международных конференций опубликовано 37 работ.

Основные положения и результаты докторской работы представлялись и докладывались на следующих конференциях, съездов и симпозиумах:

ESF-EMBO Symposium «Spatio-Temporal Radiation Biology: Transdisciplinary Advances for Biomedical Applications» (Sant Feliu de Guixols, Spain, 2009); 37th Annual Meeting of the European Radiation Research Society (Prague, Czech Republic, 2009); «38th Annual Meeting of the ERRS» (Stockholm, Sweden, 2010); Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пущино, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019); «Ломоносов» (Москва, 2014, 2015); «Теоретическая и экспериментальная биофизика» (Пущино, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022); «Молекулярная диагностика» (Москва, 2014); «VI, VII, VIII Съезды по радиационным исследованиям» (Москва, 2010, 2014, 2021); «Медико-биологические проблемы действия радиации» (Москва, 2012); «Медико-биологические проблемы токсикологии и радиобиологии» (Санкт-Петербург, 2015); «VI Съезд радиобиологического общества Украины» (Киев, Украина, 2015); «V, VI Съезд биофизиков России» (Ростов-на-Дону, 2015; Сочи, 2019); «Актуальные проблемы радиобиологии и астробиологии. Генетические и эпигенетические эффекты ионизирующих излучений» (Дубна, 2016); «Современные проблемы общей и космической радиобиологии» (Дубна, 2017); «Техногенные системы и экологический риск» (Обнинск, 2018); «Smart Bio» (Kaunas, Lithuania, 2018); «Современные вопросы радиационной генетики» (Дубна, 2019); «16th IRR Congress» (Manchester, United Kingdom, 2019); «Современные проблемы радиобиологии» (Гомель, Беларусь, 2021); «American Association for Cancer Research Annual Meeting»

(Philadelphia, USA, 2021, 2022); «Актуальные проблемы радиационной биологии. К 60-летию создания Научного совета РАН по радиобиологии» (Дубна, 2022).

Результаты исследования получены при выполнении государственных контрактов и грантов, включая Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» и грантов РФФИ № 08-04-00163; № 12-04-31089; № 13-04-00485; № 12-04-31070; № 16-34-00832; № 17-29-01007.

Первичная документация проверена и соответствует материалам, включенными в диссертацию.

Заключение

Диссертационная работа Абдуллаева С.А. на тему: «Пострадиационные механизмы функционирования и стабилизации митохондриального генома» является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение. Изложены новые научно-обоснованные решения и разработки, которые вносят вклад в развитие существующих систем биологической дозиметрии. Автором предложен принципиально новый подход для персонализированной оценки лучевой реакции организма и действия других генотоксических агентов, в том числе для подбора эффективных противолучевых средств.

Диссертационная работа Абдуллаева С.А. полностью соответствуют заявленной специальности 1.5.1. – Радиобиология и требованиям п. 14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013, предъявляемым к докторским диссертациям.

Диссертация не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

Диссертация Абдуллаева Серажутдина Абдуллаевича на тему: «Пострадиационные механизмы функционирования и стабилизации митохондриального генома» рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.1 – Радиобиология.

Заключение принято на расширенном заседании секции № 1 Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» с привлечением специалистов Федерального

государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук.

Присутствовало на заседании 25 чел., в том числе 3 доктора медицинских наук, 4 доктора биологических наук, 2 кандидата медицинских наук, 4 кандидата биологических наук. Результаты голосования: «за» - 25 чел., «против» - нет, «воздержалось» - нет (протокол № 1 от 25 января 2023 г.).

Председатель совместного заседания Секции № 1
Ученого совета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И.
Бурназяна ФМБА России и лаборатории
радиационной молекулярной биологии ИТЭБ
РАН, главный научный сотрудник лаборатории
радиационной иммунологии и
экспериментальной терапии радиационных
поражений ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И.
Бурназяна ФМБА России, доктор медицинских
наук, профессор



Иванов Александр
Александрович

Секретарь Секции № 1 Ученого совета ФГБУ
ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБЛ
России, заведующая лабораторией
радиационной биофизики ФГБУ ГНЦ ФМБЦ
им. А.И. Бурназяна ФМБА России, кандидат
биологических наук



Воробьева Наталья
Юревна

Подпись доктора медицинских наук, профессора
Иванова А.А. и кандидата биологических наук
Воробьевой Н.О. удостоверяю:
Ученый секретарь ФГБУ ГНЦ ФМБЦ
им. А.И. Бурназяна ФМБА России,
кандидат медицинских наук



Голобородько Евгений
Владимирович

25.01.2023