

Отзыв

официального оппонента доктора биологических наук С.А. Васильева на
диссертационную работу Абдуллаева Серажутдина Абдуллаевича
"Пострадиационные механизмы функционирования и стабилизации
митохондриального генома", представленную на соискание ученой степени
доктора биологических наук по специальности 1.5.1. Радиобиология

Выявление факторов, влияющих на спонтанный и индуцированный темп мутирования в ядерном и митохондриальном геноме, остается важной проблемой радиобиологии и радиационной генетики. Кроме того, наблюдается недостаток быстрых и надежных неинвазивных методов определения последствий воздействия ионизирующего излучения на биологические объекты. Исследованию этих актуальных вопросов посвящено диссертационное исследование Абдуллаева Серажутдина Абдуллаевича на тему "Пострадиационные механизмы функционирования и стабилизации митохондриального генома", представленное на соискание степени доктора биологических наук по специальности 1.5.1. Радиобиология.

Структура диссертационной работы. Диссертация оформлена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 213 страницах, содержит 35 рисунков и 3 таблицы. Список цитируемой литературы включает 443 источника. 38 литературных источников являются работами последних 5 лет (2019-2023 годы).

Во **Введении** обосновывается актуальность исследования, формулируется цель и задачи диссертационной работы, указывается ее научная новизна, а также теоретическая и практическая значимость полученных результатов. Центральной идеей работы явилось исследование повреждений и восстановления mtДНК в тканях облученных животных, а также выяснение особенностей циркуляции внеклеточных ДНК в биологических жидкостях в период после облучения. Важным аспектом работы, в том числе вынесенным в формулировку цели, является анализ возможности практического использования выявленных закономерностей при оценке ответа организма на облучение и воздействие других генотоксических агентов, а также для оценки эффективности противолучевых средств.

Реализация идеи, лежащей в основе исследования, потребовала решения задач, сфокусированных на исследовании особенностей восстановления mtДНК и reparации яДНК, а также экспрессии генов, участвующих в окислительном фосфорилировании, регуляции биогенеза и динамики митохондрий в мозге крыс после облучения рентгеновскими лучами; определении общего количества фрагментов mtДНК, а также доли

С обложкой отложен 28.09.2023.

(Абдуллаев Р.А.)

ВХОД №	5841
ДАТА	25 СЕН 2023
КОЛ-ВО ЛИСТОВ:	5
ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России	1

мутированных копий mtДНК в тканях мозга и селезенки, а также в плазме крови мышей в зависимости от дозы облучения и длительности пострадиационного периода; определении общего количества фрагментов вк-мтДНК и вк-яДНК, а также доли мутированных копий вк-мтДНК в моче крыс в зависимости от дозы облучения или введения блеомицина; исследовании влияния мелатонина на митохондриальную дисфункцию и уровень восстановления mtДНК и репарацию яДНК в тканях коры мозга и селезенки облученных мышей и изучении влияния метформина на экскрецию вк-мтДНК и вк-яДНК в моче облученных крыс, а также образование микроядер в клетках костного мозга и пострадиационную выживаемость мышей. По итогам проведенных исследований автором сформулировано 6 положений, выносимых на защиту, обоснованность и достоверность которых подтверждается существенным объемом полученных и проанализированных экспериментальных данных.

Глава «**Обзор литературы**» содержит исчерпывающий анализ источников литературы, касающихся роли mtДНК в функционировании и стабильности клеток млекопитающих при действии ионизирующей радиации, включая рассмотрение вопросов биологии митохондрий, механизмов нормальных и патологических процессов в митохондриях и изменений в митохондриях при воздействии ионизирующего излучения. Акцент сделан на анализе возможности использования внеклеточной ДНК в качестве потенциального биомаркера оценки лучевой реакции организма. Также рассмотрены имеющиеся данные о влиянии радиопротекторов на функционирование митохондрий и целостность mtДНК в облученных клетках. Следует отметить, что обзор литературы хорошо структурирован, логичен и последователен.

Глава «**Материалы и методы**» содержит информацию о материале и использованных цитогенетических, молекулярно-генетических, биохимических и статистических методах. Подробно описаны схемы экспериментов, использованные группы лабораторных животных, методы обработки материала, условия проведения радиационного воздействия и анализа результатов. Работа проведена с использованием комплекса современных методов анализа соматического мутагенеза, включая микроядерный тест, полимеразную цепную реакцию (в том числе в реальном времени) и анализ уровня мутаций путем гидролиза гетеродуплексов ДНК; проведён анализ экспрессии генов. Статистические методы адекватны и не вызывают сомнений в значимости полученных результатов.

Несомненной ценностью дизайна работы является проведение исследований на мышах *in vivo* с анализом различий между тканями. Отслежена не только дозовая, но и времененная зависимость наблюдаемых эффектов. Проведен анализ различных факторов,

включающий как мутирование отдельных молекул ДНК, так и изменение их числа вследствие деления клеток и биогенеза митохондрий.

Глава «Результаты» представляет собой центральный раздел диссертационного исследования. В работе получены результаты, обладающие высокой степенью научной новизны, фундаментальной и практической значимостью. В частности, впервые обнаружено наличие в структурах головного мозга крыс повышенного уровня мутантных копий mtДНК (гетероплазмия) с одновременной активацией ее общего синтеза после радиационного воздействия, что приводит к нарушению экспрессии генов, регулирующих синтез АТФ, усилинию пролонгированного окислительного стресса в митохондриях и к их дисфункции. Показано, что мутагенез mtДНК 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). Снижение мутантных копий mtДНК быстрее протекает в активно пролиферирующих тканях (селезенка), чем в постмитотических тканях (головной мозг). Обнаружено, что резкое увеличение содержания мутантных копий вк-^{mt}ДНК в плазме облученных мышей связано со снижением их уровня в тканях этих же животных. Повышенное содержание мутантных копий вк-^{mt}ДНК и увеличение общей вк-^{mt}ДНК в плазме облученных животных зависит от дозы рентгеновского излучения и длительности пострадиационного периода.

Важным практическим результатом является то, что циркулирующие фрагменты вк-^{mt}ДНК и вк-яДНК, поступающие в кровоток облученных животных, могут преодолевать «почечный барьер» и переходить в мочу после действия радиации, а также после введения цитостатических препаратов на примере блеомицина. Выяснена дозовая зависимость этих процессов. Наконец, показано, что выявленная динамика репарации mtДНК и выведения продуктов ее распада может быть модулирована фармацевтически. Обнаружено, что введение экзогенного мелатонина до и после облучения способствует пострадиационной выживаемости животных, активации репарации ДНК и снижению митохондриальной дисфункции в тканях коры головного мозга и селезенки, а метформин усиливает экскрецию вк-^{mt}ДНК и вк-яДНК с мочой, способствуя удалению поврежденных клеток из тканей облученных животных, тем самым обеспечивая им повышение выживаемости после действия ионизирующей радиации. Положения, выносимые на защиту, хорошо обоснованы и подтверждаются подробно обсужденными результатами.

К работе имеются некоторые вопросы. Результаты электрофореза продуктов расщепления Surveyor нуклеазой гетеродуплексов ПЦР-ампликонов mtДНК (рисунки 6, 8, 12, 15, 20, 26) показывают, что продукты расщепления имеют несколько четко выраженных полос на электрофорезе, соответствующих определенным длинам фрагментов ДНК.

1. Проводился ли на основе данных результатов сравнительный анализ темпа мутирования в различных частях митохондриального генома после воздействия и выявление горячих точек мутирования?
2. С чем могут быть связаны отличия в размере продуктов расщепления после воздействия ионизирующего излучения в разных дозах и в разные периоды после радиационного воздействия?
3. Отличаются ли данные горячие точки после воздействия ионизирующего излучения и блеомицина?

Вопросы оппонента не снижают научную и научно-практическую ценность работы, не подвергают сомнению обоснованность положений и выводов и относятся к разряду дискуссионных.

Подводя итог анализу диссертационного исследования, необходимо подчеркнуть его несомненную новизну и научно-практическую значимость. В работе впервые установлено, что в клетках тканей (головной мозг, селезенка) мышей, подвергнутых воздействию разных доз рентгеновского излучения, резко возрастает уровень мутантных копий mtДНК. При этом мутагенез mtДНК в тканях головного мозга и селезенки облученных мышей, как и мутагенез ядерных генов, имеет линейную зависимость от дозы рентгеновского излучения. Проследена динамика снижения числа и доли мутантных копий митохондриальной ДНК за счет reparации, элиминации митохондрий, выхода митохондриальной ДНК в плазму крови и биогенеза митохондрий. Впервые показана для внеклеточной митохондриальной ДНК возможность преодоления почечного барьера и перехода ее в мочу после рентгеновского облучения животных, а также после введения блеомицина. Обнаруженная дозовая зависимость выявленных эффектов открывает широкие перспективы для использования уровня мутантной внеклеточной митохондриальной ДНК в качестве неинвазивного маркера для биологической дозиметрии.

Полученные данные дополняют имеющиеся представления о механизмах радиационного мутагенеза митохондриальной ДНК в различных тканях организма и способствуют более глубокому пониманию функционирования и стабилизации митохондриального генома после генотоксического воздействия.

Заключение. В связи с вышеизложенным можно заключить, что диссертация Абдуллаева Серажутдина Абдуллаевича на тему "Пострадиационные механизмы функционирования и стабилизации митохондриального генома" является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований и разработок осуществлено решение научной проблемы – анализа мутагенеза

в митохондриальном геноме при воздействии ионизирующего излучения, что имеет существенное значение для развития радиобиологии.

Работа соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» степеней (постановление Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, в редакциях от 21.04.2016 г. № 335; от 02.08.2016 г. № 748), а ее автор Абдуллаев Серажутдин Абдуллаевич заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.1. Радиобиология.

Официальный оппонент

Руководитель лаборатории инструментальной геномики
Научно-исследовательского института медицинской генетики
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук»
д-р биол. наук (1.5.7. Генетика)
Васильев Станислав Анатольевич

Подпись д-ра биол. наук С.А. Васильева удостоверяю
Ученый секретарь Федерального
государственного бюджетного научного учреждения
«Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук»
кандидат биологических наук
Хитринская Ирина Юрьевна

22.09.2023