

УТВЕРЖДАЮ

Директор



А.В. Аклеев

2019г.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Уральского научно-практического центра Радиационной медицины ФМБА России о научно-практической ценности диссертации Алипера Александра Мироновича на тему «Полнотранскриптомное исследование активации сигнальных путей при старении и действии ионизирующего излучения, поиск геро- и радиопротекторов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – Радиобиология.

### Актуальность темы диссертационного исследования

Старение организма является естественным процессом, который находится под генетическим контролем и осуществляется на всех уровнях организации живой материи от субклеточного до организменного. Однако ряд факторов, такие как образ жизни, профессиональная деятельность, окружающая среда могут способствовать интенсификации процессов старения. На сегодняшний день в области радиационной биологии и радиационной медицины особый интерес представляет исследование влияния ионизирующего излучения (как хронического, так и однократного в широком диапазоне доз) на механизмы старения организма. Согласно эпидемиологическим данным, а также экспериментальным исследованиям, на животных показано, что ионизирующее излучение способствует ускоренному развитию возраст-зависимых заболеваний. В связи с этим важное значение имеют исследования, раскрывающие

ход молекулярно-  
ДАТА 28.05.2019  
КОЛ-ВО ЛИСТОВ: 14 19  
ФГБУ ГНЦ ФМБЦ  
им. А.И. Бурназяна ФМБА России

генетические механизмы, связанные с эффектом действия ионизирующего излучения и старения. Одним из актуальных направлений исследований в этой области является анализ изменения транскриптора и сигналима в ответ на действие различных факторов, в том числе, ионизирующего излучения.

### **Научная новизна и практическая значимость**

Диссертационная работа посвящена полнотранскриптомному анализу экспрессии генов сигнальных путей, принимающих участие в старении и ответе клетки на радиационное воздействие. Показано, что процессы старения и эффекты воздействия ионизирующего излучения имеют сходные сигнальные и метаболические пути на уровне активации экспрессии ряда генов.

При проведении биоинформационического анализа результатов транскриптомного исследования на культурах фибробластов, полученных от пациентов разного возраста, репликативно состаренных фибробластах и в культурах фибробластов облученных в дозе 5 сГр и 2 Гр, было показано, что профиль экспрессии фибробластов человека, облученных в дозе 2 Гр, сведен с профилем репликативно состаренных фибробластов. Было установлено, что в ответ на воздействие ИИ активируются сигнальные пути, запускаемые генами TP53, ATM, МАРК, повышается экспрессия генов дифференцировки и апоптоза, что способствует индукции белков теплового шока и клеточного старения, изменяется регуляция клеточного цикла и синтез провоспалительных цитокинов.

В рамках диссертационной работы был разработан алгоритм GeroScope, который позволяет учитывать особенности метаболического профиля «старых» и «молодых» клеток. Описаны созданные при участии докторанта две открытые и курируемые базы данных геропротекторов и радиопротекторов с радиометигаторами, которые содержат информацию на 200 геропротекторных соединений и 150 радиопротекторных соединений.

Все молекулы, содержащиеся в базах данных, классифицированы и могут быть отсортированы по свойствам.

Представленные в работе биоинформационные подходы, а также созданная база данных радиопротекторов и радиомитигаторов могут быть использованы для идентификации генетических маркеров радиационного воздействия, а также поиска новых радиопротекторов.

### **Достоверность полученных результатов**

Достоверность полученных результатов обеспечивается научно-обоснованным выбором методов биоинформационического и статистического анализа данных. При поиске геропротекторов был использован разработанный алгоритм GeroScope, позволяющий идентифицировать сигнальные пути и вещества-геропротекторы. Идентифицированные геропротекторы были верифицированы экспериментально *in vitro* на культурах фибробластов человека.

### **Структура диссертации**

Диссертационная работа включает в себя введение, три главы (литературный обзор, основные методы и подходы, результаты и обсуждения), выводы, список сокращений, список литературы, состоящий из 456 источников и приложения. Текст диссертации изложен на 171 странице и сопровождается 18 таблицами и 17 рисунками.

Во **введении** кратко представлена актуальность темы исследования, сформулированы цель, задачи исследования и научные положения, научная новизна и практическая значимость работы. Научные положения, выносимые на защиту, логично вытекают из полученных данных. Цель исследования корректно сформулирована, а задачи полностью соответствуют поставленной цели.

**Первая глава** посвящена обзору литературы, в котором рассматривается сравнение процессов старения и эффектов облучения на

живые организмы и состоит из 6-ти подразделов. В главе представлены сравнительные данные о возраст-зависимых заболеваниях и медицинских эффектах облучения на примере онкологических заболеваний, сердечно-сосудистых заболеваний и др. Рассмотрены молекулярно-генетические механизмы старения в сравнении с механизмами повреждения клеточных структур при действии ИИ. Указывается особая роль окислительного стресса в повреждении клеточных структур, рассматривается процесс апоптоза и нестабильности генома как при старении, так и в результате радиационного воздействия. Представлены современные данные об изменении продолжительности жизни при радиационном облучении. Глава «Обзор литературы» написана хорошим научным языком, несомненным достоинством данной главы является критический обзор современных данных по изучаемой проблеме.

Во второй главе перечислены способы анализа данных генной экспрессии и сигнальных путей, приведен список используемого в работе программного обеспечения и баз данных. Обосновываются используемые биоинформационные методы анализа дифференциальной экспрессии генов.

Результаты исследования и их обсуждение представлены в третьей главе и разбиты на три подраздела. Каждый подраздел сопровождается литературным обзором, описанием материалов и методов исследования, представлены результаты собственных исследований и их обсуждение. В первом подразделе автор диссертации приводит результаты анализа экспрессии генов в культурах клеток, полученных от пациентов, разных возрастов, репликативно состаренных фибробластах и фибробластов полученных от пациентов с синдромом прогерии Хатчинсона-Гилфорда. Автор указывает на сходство сигнальных путей в клетках, полученных от пациентов с СПХГ и здоровых людей среднего и пожилого возраста. Во втором подразделе приводятся сравнения экспрессии генов и сигнальных путей в фибробластах облученных *in vitro* в дозах 5 сГр и 2 Гр с репликативно состаренными не облученными фибробластами. Было

показано, что экспрессия генов в фибробластах облученных в дозе 2 Гр сходна с экспрессией генов в репликативно состаренных не облученных фибробластах. В заключительном третьем подразделе представляются результаты использования разработанного алгоритма GeroScope для поиска ассоциированных с возрастом сигнальных путей и геропротекторов, на основе экспрессии генов человека. Представлены результаты по валидации найденных геропротекторов на культурах фибробластов человека, а также описаны структура созданных базы данных геропротекторов и радиопротекторов с радиомитигаторами.

Сделанные выводы полностью соответствуют результатам исследования и отвечают на поставленные в диссертационной работе задачи.

По теме диссертационной работы опубликовано 6 статей в журналах из перечня ВАК. Результаты работы были доложены на международных конференциях.

Тем не менее имеется ряд замечаний, преимущественно редакционного характера.

1. Заголовок 1-го подраздела в главе результаты исследования «*Активация сигнальных путей в процессе старения: фибробласты больных прогерией Хатчинсона-Гильфорда сопоставимы с клетками здоровых людей среднего и пожилого возраста*» звучит как заключение или результат.
2. Перед каждым подразделом результатов исследования автор включил литературный обзор, что затрудняет восприятие собственных результатов исследования.
3. Не совсем корректно сформулированы ряд выражений и терминов: *байстандер эффект*, правильно *эффект свидетеля*; *даунрегулируемые и аппрегулируемые гены*, правильно *понижающая и повышающая регуляция*; *сырые данные*, правильно *первичные данные*; *кит*, правильно *реагенты*; *датасеты*, правильно *данные*.

4. На стр. 40 имеется ссылка на Таблицу 3.3.1, однако в диссертации таблицы с таким номером нет.
5. Рисунок 3.1.2 на стр. 46 «График кросс-корреляций для «молодой», «средний», «пожилой» и «СПХГ» групп фибробластов» плохо читается, невозможно выделить на графике группы «молодая», «средняя», «пожилая» и «СПХГ».
6. На рисунок 3.1.4 стр. 48 названия сигнальных путей, указаны на английском языке, однако большинство из них переводятся на русский язык.
7. На стр. 67 автор делает вывод что «спустя 24 часа после облучения дозой 2 Гр клетки не регенерируют, а погибают». Данное утверждение является не корректным, поскольку автор не приводит результаты выживания клеточной популяций, а делает заключения лишь на основе уровне экспрессии генов.
8. Не совсем понятно, что означает понятие на стр. 70 «молодого здорового клеточного состояния».
9. Абзац на страницах 75-76 после подзаголовка «Проточная цитометрия» полностью повторяется после таблица 3.3.1.1. на стр. 76.
10. На рисунок 3.3.1.1. подписи осей на английском языке.
11. Таблица 3.3.1.2 на стр. 80 не читается, не понятно значение обозначения «=».
12. На стр. 74 указан параметр оценки клеток на проточном цитометре «флюоресценция F1», корректно указать используемую длину волны по каналу флюоресценции F1 и какой биологической параметр оценивался.

Перечисленные замечания относятся к оформлению выполненной работы и не снижают ее общей ценности.

Вопросы к автору диссертационной работы.

1. В работе использовались данные экспрессии генов, полученные при облучении фибробластов в дозе 5 сГр и 2 Гр, в связи с этим возникают следующие вопросы, которые не раскрыты при описании клеточных культур: От пациентов какого возраста были получены фибробласти, которые подверглись облучению? Какая была мощность дозы облучения фибробластов и есть ли зависимость экспрессии генов от мощности дозы?
2. Как результаты, представленные в третьем подразделе по поиску и валидации геропротекторов могут быть связаны с решением радиобиологических задач? Возможно ли использовать разработанный алгоритм GeroScope для установления сигнальных путей при радиационном воздействии и поиске радиопротекторов?

## **Заключение**

Диссертационная работа Алипера Александра Мироновича на тему «Полнотранскриптомное исследование активации сигнальных путей при старении и действии ионизирующего излучения, поиск геро- и радиопротекторов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук, выполненной под руководством доктора биологических наук, профессора РАН Осипова А.Н., является законченной научно-квалификационной работой. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Алипера Александра Мироновича соответствует требованиям п. 9 и п. 14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., с изменениями Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335 в редакции Постановления Правительства РФ от 2 августа 2016 г. № 748, предъявляемым к кандидатским диссертациям, ее автор - Алипер Александр Миронович –

заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 - Радиобиология.

Отзыв подготовлен кандидатом биологических наук, и.о. заведующей лабораторией молекулярно-клеточной радиобиологии Блиновой Евгенией Андреевной, обсужден и одобрен на заседании Ученого совета ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства» (протокол № 3 от 22.05. 2019 г.).

И.о. заведующего лабораторией  
молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН УНПЦ РМ  
ФМБА России, ул. Воровского, д. 68-А,  
г. Челябинск, 454076,  
E-mail: blinova@urcrm.ru  
тел. (351) 232-79-22  
кандидат биологических наук

Е.А. Блинова

Подпись Е.А. Блиновой заверяю:  
Учёный секретарь ФГБУН УНПЦ РМ  
ФМБА России

С.А. Большакова



«22» мая 2019 г.

Федеральное государственное учреждение науки  
Уральский научно-практический центр радиационной медицины  
ФМБА России  
454076, Челябинск, ул. Воровского, 68А  
Тел.: 8(351) 232-79-14, E-mail: urcrm@urcrm.ru