

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Алипера Александра Мироновича на тему: «Полнотранскриптомное исследование активации сигнальных путей при старении и действии ионизирующего излучения, поиск геро- и радиопротекторов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – радиобиология

Актуальность темы выполненной работы

Понимание механизмов, лежащих в основе старения как целого организма человека, так и отдельных его клеток, критично для обеспечения здорового долголетия населения. Учитывая, что старение является результатом действия множества внутренних и внешних повреждающих факторов, не менее актуальной в разрезе вопроса о механизмах старения представляется и проблема выявления путей ответа клеток на воздействие мутагенов, и в первую очередь, ионизирующего излучения. Поиску ответов эти сложные вопросы и посвящена диссертационная работа Александра Мироновича Алипера, в которой изучаются механизмы регуляции активности генов, характерные для клеток при старении и после радиационного воздействия. Актуальность темы данного исследования определяется недостаточностью имеющихся сведений о молекулярных путях регуляции транскриптома клеток, связанных как с воздействием ионизирующего излучения, так и со старением.

Новизна исследования

Диссертационное исследование посвящено биоинформационской обработке полнотранскриптомных данных, полученных на стареющих клетках и клетках после воздействия ионизирующего излучения. Поэтому новизна работы определяется, в первую очередь, уникальностью подхода к анализу таких данных. В рамках диссертации соискателем разработан уникальный алгоритм GeroScope для анализа транскриптомных данных и поиска геро- и радиопротекторов. Применение данного метода на всех этапах работы позволило получить новые данные о сходствах и различиях процессов старения и радиационно-индукционного ответа в клетках на уровне экспрессии генов и активности сигнальных путей. Было впервые показано сходство профиля генной экспрессии фибробластов, облученных в дозе 2 Гр, с профилем репликативно состаренных фибробластов. В рамках диссертации созданы две открытые и курируемые базы данных веществ геро- и радиопротекторов, что имеет большое значение для облегчения последующих исследований по обнаружению и валидации перспективных препаратов.

ВХОД №	747
ДАТА	07.06.2019
КОЛ-ВО ЛИСТОВ:	5
ФГБУ НЦ ФМБЦ	
им. А.И. Бурназяна ОМБР, Россия	

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Полученные в анализируемой диссертационной работе результаты и сформулированные выводы полностью соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Тщательно составленный обзор литературы достаточно подробно затрагивает все ключевые работы по тематике исследований автора диссертации и отражает полноту его представлений о современных достижениях науки в этой области. Сделанные выводы логичны обоснованы и логически вытекают из результатов исследования.

Основные материалы диссертации опубликованы в 6 статьях в международных журналах, входящих в базы данных Web of Science и Scopus. Кроме того, получен один международный патент на способ анализа транскриптомных данных.

Автор диссертации демонстрирует уверенное владение статистическими методами обработки результатов экспериментов. Это обстоятельство существенно усиливает доверительное отношение к результатам работы.

Значимость для науки и практики

Результаты диссертационного исследования расширяют имеющиеся представления о механизмах обеспечения процессов старения и радиационно-индуцированного транскрипционного ответа. Полученные данные свидетельствуют о существенном перекрывании между данными процессами на уровне активации общих сигнальных путей.

С практической точки зрения наиболее ценными представляются два результата: создание алгоритма GeroScope по определению перспективности геро- и радиопротекторов и создание баз данных геро- и радиопротекторов. В будущем разработанные инструменты могут использоваться в исследованиях по обнаружению и валидации перспективных препаратов против старения и для защиты клеток от мутагенного воздействия.

Общая характеристика работы

Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста, содержит 16 рисунков и 19 таблиц, и состоит из введения, литературного обзора, посвященному влиянию излучения и старения на живые организмы, методов и подходов, используемых в работе, результатов и обсуждения, и выводов. Библиографический указатель содержит 456 источников и представляется исчерпывающим.

Введение содержит описание целей и задач исследования, научную новизну, практическую значимость, положения, выносимые на защиту, а также описание личного вклада автора. Имеется замечание по формулировке первых двух задач. Обе задачи предполагают исследование «клеток человека».

При этом фактически в работе исследовались только фибробласты кожи. Поэтому такая формулировка задач представляется слишком широкой.

В **литературном обзоре**, состоящем из 6 разделов, описываются различные последствия действия на организмы старения и ионизирующего излучения, проводится их сравнение. В главе "**Основные методы и подходы, используемые в работе**" описаны основные способы анализа данных генной экспрессии и сигнальных путей, приведен список используемого программного обеспечения и баз данных. Необходимо отметить, что в главе "**Основные методы и подходы, используемые в работе**", приведены лишь биоинформационные методы, а описание всех остальных материалов и методов, а также схем конкретных экспериментов, вынесено в подразделы главы «**Результаты и обсуждения**». С одной стороны, это удобно для понимания результатов по конкретным блокам работы, с другой стороны, очень не хватает обзорной общей схемы исследования, которая могла бы быть приведена в главе «**Основные методы и подходы, используемые в работе**». Это бы сильно облегчило целостное понимание того, что именно делалось в работе.

Глава «**Результаты и обсуждения**» разбита на три подраздела: в первом обсуждается влияние на экспрессионный ответ фибробластов репликативного старения, хронологического старения, а также синдрома прогерии Хатчинсона-Гилфорда, во втором – сравнение действия излучения и репликативного старения, в заключительной части обсуждаются вещества, которые могут выступать в качестве геро- и радиопротекторов. Как уже отмечалось выше, каждый подраздел главы «**Результаты и обсуждение**» включает описание методов, использованных в данном блоке работы. Часть из первичных результатов перенесены в 7 таблиц Приложения. В целом все полученные данные всесторонне и корректно обсуждены.

В главе «**Результаты и обсуждение**» присутствует заключение для каждого блока работы. Однако недостает общего заключения по всем этапам исследования, которое бы обобщало и придавало цельность всей диссертационной работе.

Выводы обоснованы, соответствуют поставленной цели и задачам, логично следуют из полученных результатов.

В **автореферате** отражены основные положения и результаты выполненной работы.

В работе достаточно много опечаток и несогласований, что затрудняет понимание чтение диссертации. Например, есть несогласование падежей в формулировке цели работы (в диссертации, но не в автореферате) («**основанного**» вместо «**основанный**»), а также в формулировке выводов.

По прочтению диссертации возникли следующие вопросы:

1. В исследовании указывается, что в качестве статистически значимых изменений уровня экспрессии генов принимались изменения экспрессии в $> 1,5$ раз и $p < 0,05$. Обычно в подобного рода исследованиях принимается в качестве порога изменение экспрессии гена в > 2 раза и используется поправка на множественность сравнений, применение которой описано в работе только для поиска веществ-геропротекторов. С чем связано такое ослабление порогов и за счет чего нивелируется влияние ложнопозитивных результатов?
2. При описании изменения экспрессии генов использованы различные полуколичественные описательные термины: "незначительная", "умеренная", "мягкая" и просто "повышающая" или "поникающая регуляция". Каковы были пороги, которые позволили бы представить, сколько генов должно повысить (или снизить) свою экспрессию в одном сигнальном пути и во сколько раз, что бы регуляция была признана, к примеру, "мягкой" или "умеренной"?
3. В первом блоке работы, связанном со старением, много говорится о совпадении на уровне активации или подавления экспрессии генов сигнальных путей. Наблюдались ли соответствующие совпадения на уровне отдельных генов, как это подробно обсуждается далее в работе при анализе влияния радиации? Если нет, то чем это может быть обусловлено?
4. В последней части работы по поиску геропротекторов в качестве "старой" культуры используются фибробласты, прошедшие 26 пассажей, тогда как в первой части работы фибробласты после 30 пассажей использовались в качестве контрольной "молодой" группы сравнения. Кроме того, при проверке геропротекторов, отличия между "молодой" и "старой" культурами составили лишь 2 пассажа (24 против 26 пассажей), что достаточно мало. Особенно по сравнению с различиями в 40-50 (30 против 70 или 80) пассажей в первой части работы. С чем связаны такие отличия в дизайне экспериментов?
5. Оценка геропротекторного эффекта различных препаратов с помощью алгоритма Geroscope была проведена на наборе данных, полученных от гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток человека. При этом экспериментальная проверка производилась на фибробластах легкого. С чем связан выбор для анализа как первых, так и второго типов клеток?

Приведенные замечания не влияют на общее исключительно благоприятное впечатление от диссертационной работы А.М. Алипера.

Заключение

Научно-исследовательская работа Алипера Александра Мироновича «Полнотранскриптомное исследование активации сигнальных путей при старении и действии ионизирующего излучения, поиск геро- и радиопротекторов» является самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная проблема по разработке подхода для поиска эффективных геро- и радиопротекторов, основанного на анализе профилей генной экспрессии клеток человека при старении и в результате воздействия ионизирующего излучения. Результаты работы имеют важное теоретическое значение для понимания механизмов транскриптомного ответа клеток на воздействие неблагоприятных факторов. Разработанный в исследовании подход к анализу полнотранскриптомных данных может быть в дальнейшем использован при разработке перспективных геро- и радиопротекторных препаратов. Сделанные выводы хорошо обоснованы и имеют большое значение для решения проблем радиобиологии и геронтологии.

Работа А.М. Алипера по актуальности изучаемой проблемы, научной новизне, практической значимости, полноте изложения и обоснованности выводов отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842), а автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – радиобиология.

Старший научный сотрудник лаборатории цитогенетики
Научно-исследовательского института медицинской генетики
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук» (Томский НИМЦ)

доктор биологических наук

 С.А. Васильев

Адрес: 634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, 10

Тел.: (3822) 51-31-46

e-mail: stanislav.vasiliyev@medgenetics.ru

Подпись С.А. Васильева заверяю



Ученый секретарь Томского НИМЦ
канд. биол. наук



И.Ю. Хитринская