

**“УТВЕРЖДАЮ”**

Директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, д.б.н. А.М. Кудрявцев

“16” декабря 2018 г.



### **ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН о научно-практической ценности диссертации Греховой Анны Константиновны на тему «Особенности образования и репарации двунитевых разрывов ДНК в фибробластах кожи человека, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения в малых и средних дозах» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – Радиобиология

#### **Актуальность темы диссертационного исследования**

Представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук диссертация посвящена исследованию актуальной проблемы – молекулярным механизмам формирования эффектов облучения в малых (10-100 мГр) и средних (100-1000 мГр) дозах в фибробластах кожи человека. Важность изучения биологических эффектов действия ионизирующего излучения (ИИ) в малых и средних дозах связана с использованием ионизирующей радиации при проведении медицинских диагностических процедур. Имеющиеся данные о влиянии ИИ в дозах 10-1000 мГр противоречивы: от радиационного гормезиса и феномена радиоадаптивного ответа до увеличения риска возникновения онкологических заболеваний. В этой связи очевидна необходимость изучения механизмов возникновения и репарации двунитевых разрывов ДНК после воздействия ИИ. Результаты

ВХОД №	1523
ДАТА	29 12 18
КОЛ-ВО ЛИСТОВ:	1
ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России	

исследования чрезвычайно важны для оценки эффективности репарации ДР ДНК и в клинической практике могут быть использованы при определении индивидуальной радиочувствительности.

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

В диссертационной работе на несинхронизированной популяции фибробластов кожи человека в течение первых суток проведен детальный (по минутам и часам) анализ возникновения и репарации радиационно-индуцированных ДР ДНК, обнаруживаемых с помощью иммуноцитохимического анализа фокусов фосфорилированного корового гистона H2AX ( $\gamma$ H2AX). Впервые установлено, что абсолютное и относительное количество фокусов  $\gamma$ H2AX, фокусов активной фосфорилированной киназы ATM (pATM) и ключевого белка гомологичной рекомбинации Rad51 через 24 ч в клетках, облученных в дозах малого (20 – 80 мГр) диапазона было выше, чем после воздействия ИИ в средних дозах (160 – 1000 мГр). Обнаружено, что увеличение количества фокусов белков репарации через 24 ч после облучения клеток в дозах малого диапазона связано с образованием их *de novo* в результате стимуляции пролиферативной активности фибробластов. Полученные результаты опровергают гипотезы о неэффективной, а также индуцибелльной репарации ДНК после облучения в малых дозах.

Впервые показано, что репарация двунитевых разрывов ДНК, индуцированных облучением в малых дозах, происходит более «корректно», чем после облучения в средних дозах.

Полученные результаты позволили понять механизм формирования через 24 ч «остаточных» фокусов  $\gamma$ H2AX, pATM и Rad51 в фибробlastах кожи человека и прояснить их биологическую значимость после облучения в малых дозах, объяснив этот феномен повышением пролиферативной активности клеток. Этот результат также интересен и с практической точки зрения при применении метода количественной оценки фокусов  $\gamma$ H2AX в биодозиметрии.

Данные, полученные в работе Греховой А.К., показывают, что необходимо учитывать особенности клеточных культур при проведении биодозиметрии.

В целом, полученные результаты характеризуются значительной научной новизной, представляют не только теоретический, но и практический интерес для дальнейшего развития радиационной биологии и медицины.

### **Достоверность полученных результатов**

Работа выполнена на современном методическом уровне. Обзор литературы, постановка цели и задач исследования, проведение и обсуждение результатов свидетельствуют о хорошей теоретической и методической подготовленности диссертанта. Выводы, сформулированные в диссертации, обеспечиваются качественным анализом научной литературы по изучаемой проблематике, применением адекватных статистических методов обработки данных.

Все описанные эффекты характеризуются высокой статистической значимостью.

Основные положения исследования доложены на Международных конференциях высокого уровня. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций (из них 1 статья в престижном зарубежном журнале с высоким импакт-фактором). Автореферат и печатные работы полностью соответствуют материалам диссертации.

Таким образом, полученные А.К. Греховой научные результаты и выводы являются обоснованными и достоверными.

### **Структура диссертации**

Диссертационная работа включает в себя введение, три главы, заключение, выводы, список сокращений, список литературы, состоящий из

147 источников (из них 133 на иностранном языке) и приложение. Основной текст диссертации изложен на 111 страницах, сопровождается 29 рисунками.

Во **введении** раскрыта актуальность темы исследования, определены цели и задачи исследования, сформулированы основные положения, обладающие научной новизной и выносимые на защиту.

**Первая глава** диссертации посвящена обзору литературы, в котором рассматриваются сведения о белке  $\gamma$ H2AX как маркере двунитевых разрывов ДНК вне условий облучения и после радиационного воздействия, роли и механизмах фосфорилирования H2AX киназами, основные механизмы репарации ДР ДНК, влияние структуры хроматина и фаз клеточного цикла на образование и деградацию радиационно-индукционных фокусов  $\gamma$ H2AX, включая причины их длительного поддержания. Обзор литературы (22 стр.) затрагивает все ключевые работы по тематике исследований, хорошо читается и представляет самостоятельный интерес для широкого круга радиобиологов, врачей и генетиков.

Во **второй главе** перечислены экспериментальные методы и схемы исследований, направленные на решение задач диссертационной работы. В главе подробно описываются характеристика, методы выделения и культивирования фибробластов, условия облучения, а также проведение иммуноцитохимического анализа.

Основные экспериментальные результаты и их обсуждение представлены в **третьей главе**. Приводятся данные по образованию и репарации количества фокусов  $\gamma$ H2AX и pATM в зависимости от дозы облучения в несинхронизированных, покоящихся, пролиферирующих и находящихся в S/G2 фазах популяциях фибробластов. Проводится сравнительное исследование изменения числа фокусов  $\gamma$ H2AX, pATM и Rad51 в течение 24 ч и оценка доли «остаточных» фокусов после воздействия рентгеновского излучения в малых и средних дозах. Рассчитывается вклад гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК после облучения в малых и средних дозах.

Сделанные выводы полностью соответствуют результатам исследования и, безусловно, впечатляют новизной и определенностью формулировок.

### **Замечания**

Принципиальных замечаний к работе нет. Работа написана предельно ясно, хорошо структурирована и прекрасно иллюстрирована. Имеются незначительные замечания редакционного характера:

1. В автореферате ряд обозначений (например, НГСК, РИФ и др.) используются без расшифровки, которые присутствуют лишь в тексте диссертации.
2. Опечатка на рис. 6 (в автореферате рис. 2): «ядо» вместо ядро.

Приведенные замечания не влияют на, безусловно, высокую оценку диссертационной работы и полученных в ней результатов.

### **Заключение**

Диссертационная работа Греховой Анны Константиновны на тему «Особенности образования и reparации двунитевых разрывов ДНК в фибробластах кожи человека, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения в малых и средних дозах» на соискание ученой степени кандидата биологических наук является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора биологических наук, профессора РАН Осипова А.Н., содержащей новое решение актуальной научной задачи – изучение молекулярных механизмов формирования эффектов облучения в малых (10-100 мГр) и средних (100-1000 мГр) дозах в фибробластах кожи человека, имеющей существенное значение для специальности 03.01.01 - Радиобиологии. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Греховой Анны Константиновны соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением

Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, ее автор – Грехова Анна Константиновна – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – Радиобиология.

Зав.лаб. экологической генетики ИОГен РАН

доктор биологических наук

Рубанович Александр Владимирович

Отзыв утвержден на семинаре лаборатории экологической генетики ИОГен РАН 31.08.18 (протокол № 55).

Рук. Семинара главный научный сотрудник ИОГен РАН

доктор биологических наук

Сальникова Любовь Ефимовна

Подпись Рубановича Александра Владимировича заверяю:

ученый секретарь ИОГен РАН

доктор биологических наук

Огаркова Ольга Александровна

«16» декабря 2018 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

119991, Москва, ГСП-1, ул. Губкина, 3

Тел.: 8(499)135-62-13, E-mail: iogen@vigg.ru

Избранные работы сотрудников института за последние 5 лет по теме, соответствующей данной диссертации:

1. Kuzmina N.S., Lapteva N.S., Rusinova G.G., Azizova T.V., Vyazovskaya N.S., Rubanovich A.V. Gene hypermethylation in blood leukocytes in humans long term after radiation exposure - Validation set. // Environ Pollut. 2018. V. 234. P. 935-942.

- 2: Nikitski A.V., Rogounovitch T.I., Bychkov A., Takahashi M., Yoshiura K.I., Mitsutake N., Kawaguchi T., Matsuse M., Drozd V.M., Demidchik Y., Nishihara E., Hirokawa M., Miyauchi A., Rubanovich A.V., Matsuda F., Yamashita S., Saenko V.A. Genotype Analyses in the Japanese and Belarusian Populations Reveal Independent Effects of rs965513 and rs1867277 but Do Not Support the Role of FOXE1 Polyalanine Tract Length in Conferring Risk for Papillary Thyroid Carcinoma. // Thyroid. 2017. V. 27(2). P.224-235.
- 3.Кузьмина Н.С., Лаптева Н.Ш., Русинова Г.Г., Азизова Т.В., Вязовская Н.С., Рубанович А.В. Гиперметилирование промоторов генов в лейкоцитах крови человека в отдаленный период после перенесенного радиационного воздействия. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. Т. 57. № 4. С. 341-356.
4. Kuzmina N.S., Lapteva N.S., Rubanovich A.V. Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure. // Environmental Research. 2016. V. 146. P. 10-17.
5. Rubanovich A.V., Khromov-Borisov N.N. Genetic risk assessment of the joint effect of several genes: Critical appraisal. // Russian Journal of Genetics. 2016. V.52. № 7. P. 757-769.
6. Кузьмина Н.С., Мязин А.Е., Лаптева Н.Ш., Рубанович А.В. Изучение aberrантного метилирования в лейкоцитах крови ликвидаторов аварии на ЧАЭС. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54. № 2. С. 127-139.
7. Сальникова Л.Е., Чумаченко А.Г., Белопольская О.Б., Рубанович А.В. Генетические и цитогенетические предикторы радиочувствительности хромосом человека. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53. № 3. С. 259-266.

Список работ сотрудников Института по теме диссертации заверяю:

ученый секретарь ФГБУН ИОГен РАН

доктор биологических наук



Огаркова Ольга Александровна

