

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Греховой Анны Константиновны
«Особенности образования и репарации двунигетевых разрывов ДНК в фибробластах
кожи человека, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения в малых и
средних дозах», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 03.01.01 – Радиобиология

Актуальность избранной темы

На протяжении долгого времени в радиобиологии и радиационной безопасности существовали и продолжают существовать по настоящее время три главных подхода, основанные на данных, полученных на базе анализа последствий атомной бомбардировки: (а) любая поглощенная доза является вредной; (б) существует линейная связь между дозой облучения и регистрируемым эффектом; (в) действие ионизирующего излучения является кумулятивным. Стандарты радиационной безопасности большинства стран и рекомендации международных организаций основываются на этой триаде. Практически всем исследователям понятно, что эти парадигмы, основанные на результатах острого облучения, нуждаются в уточнении и пересмотре, особенно в области небольших доз. Диссертационная работа Греховой А.К. посвящена актуальной проблеме современной радиобиологии – изучению механизмов реакции клеток ответа на воздействие редкоионизирующего излучения в малых (10–100 мГр) и средних (100–1000 мГр) дозах.

Хорошо известно, что в организме наиболее поражаемыми являются кроветворная ткань и желудочно-кишечный тракт. Следующее место по радиочувствительности занимает кожа. Однако известно, что локальные поражения кожи являются наиболее частыми среди всех других лучевых поражений, особенно при медицинских обследованиях. Важная роль в заживлении радиационных поражений принадлежит фибробластам, от пролиферативной активности которых зависит заживление пораженных участков ткани. При воздействии на клетки ионизирующего излучения и многих других физических и химических агентов могут образовываться как одиночные,

ВХОД №	1522
ДАТА	29.12.18
КОЛ-ВО ЛИСТОВ:	9
ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России	

так и двойные разрывы ДНК. Целостность структуры ДНК определяет пролиферацию многих клеток организма, включая фибробласты. Неполное восстановление структуры ДНК может приводить не только к гибели клеток, но и к отдаленным последствиям действия ионизирующего излучения, включая генетическую нестабильность, старение клеток и их злокачественную трансформацию. Поэтому цель диссертационной работы А.К. Греховой, сформулированная как изучение закономерностей образования и репарации двунитевых разрывов ДНК, индуцированных рентгеновским излучением в малых и средних дозах в культивируемых фибробластах кожи человека, безусловно, является актуальной современной задачей.

Научная новизна результатов исследования и их практическая значимость

Известно, что белок γ H2AX является маркером двунитевых разрывов ДНК. Фактически, фокусы этого белка отражают количество двунитевых разрывов ДНК. В работе получены новые данные о характере изменений количества фокусов γ H2AX и фокусов активной киназы АТМ, а также их солокализации в зависимости от интенсивности клеточной пролиферации в фибробластах кожи человека, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения в малых (20–80 мГр) и средних (160–1000 мГр) дозах. Обнаружено значительное различие в кинетике репарации двунитевых разрывов ДНК в фибробластах, подвергнутых облучению рентгеновским излучением в малых и средних дозах.

Во-первых, это различие заключается в том, что после облучения клеток в малых дозах, в отличие от действия ионизирующего излучения в средних дозах, регистрируется длительное присутствие повышенного количества фокусов ряда белков (γ H2AX, pATM и Rad51), которое обусловлено образованием их *de novo* в результате стимуляции пролиферативной активности клеток. Известно, что репарация ДР ДНК запускается только после достижения определенного порогового количества повреждений ДНК в геноме (индуцибельная репарация). В рецензируемой работе отмечается эффективное фосфорилирование H2AX после облучения в малых дозах, свидетельствующее о распознавании ДР и

начале процессов их репарации. Полученные результаты опровергают гипотезы о неэффективной, а также индуцибельной репарации ДНК после облучения фибробластов в малых дозах. Действительно, показано, что после облучения в малых дозах происходит правильная репарация ДНК, происходящая рекомбинационным путем по пути безошибочной гомологичной рекомбинации за счет использования неповрежденной сестринской хроматиды в качестве матрицы.

Во-вторых, дозы ионизирующего излучения, относящиеся к диапазону малых доз (20–80 мГр) в отличие от диапазона средних доз (160–1000 мГр) не тормозят прохождения фибробластов по фазам клеточного цикла и увеличивают долю клеток в пролиферирующем пуле. Полученные результаты позволили понять механизм формирования «остаточных» фокусов γ H2AX. Отмечу, что механизм формирования «остаточных» фокусов γ H2AX, pATM и Rad51 заключается в образовании их *de novo* в результате клеточной пролиферации. Этот результат интересен, прежде всего, с практической точки зрения, поскольку фокусы γ H2AX в настоящее время имеют широкое применение в биодозиметрии. Эти важные новые результаты позволили прояснить их биологическую значимость. Считалось, что клетки с «остаточными» фокусами γ H2AX и Rad51 нежизнеспособны. В диссертации показано, что после воздействия малых доз ионизирующего излучения «остаточные» фокусы наблюдаются в пролиферирующих клетках.

В-третьих, репарация двунитевых разрывов ДНК, индуцированных облучением в малых дозах, является более «корректной» по сравнению с действием средних доз. Именно этот результат может иметь наибольшую практическую значимость, особенно, при оценке опасности облучения человека в малых дозах во время проведения медицинских радиологических процедур.

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

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации и их достоверность

Научные положения и выводы диссертационной работы Греховой А.К. основаны на обширном экспериментальном материале, поэтому являются обоснованными и достоверными. Результаты работы отражены в солидных научных публикациях. Они также были неоднократно представлены на российских и международных конференциях. Важно подчеркнуть, что диссертация выполнена на современном методическом уровне, соответствующем мировым стандартам. Суть этих стандартов сводится к тому, что любые радиобиологические, генетические или экологические работы должны сопровождаться анализом механизмов на молекулярном уровне. В работе использованы такие надежные методы, как культивирование фибробластов, иммунофлуоресцентное окрашивание белков, участвующих в процессе репарации ДНК, иммуноцитохимическое выявление пролиферирующих, покоящихся и находящихся в S/G2 фазах популяций фибробластов кожи человека. Поэтому надежность полученного экспериментального материала не вызывает сомнений.

Оценка содержания и оформления работы

Диссертационная работа написана по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, описание результатов исследования с их обсуждением, заключение, выводы, список сокращений и список литературы, состоящий из 147 источников (из них 133 на иностранном языке) и приложение. Текст диссертации изложен на 111 страницах машинописного текста и включает 29 рисунков.

Во введении автором обоснована актуальность темы исследования, раскрыта степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи исследования, определены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, а также положения, выносимые на защиту, описаны методология и методы исследования, степень достоверности полученных результатов. Обзор

литературы занимает 22 стр. и представлен четырьмя разделами. Первый из них посвящен характеристике белка H2AX, который является маркером двуниевых разрывов ДНК, и его анализу в необлученных фибробластах. Во втором разделе обзора автор приводит данные литературы, касающиеся образования фокусов γ H2AX при радиационном воздействии. В третьем разделе подробно анализируются сведения об особенностях репарации двуниевых разрывов ДНК, вызванных рентгеновским излучением. Четвертый раздел посвящен рассмотрению возможных причин поддержания остаточных радиационно-индуцированных фокусов γ H2AX. Обзор написан хорошим литературным языком, легко читается, включает современные сведения по изучаемым вопросам и вводит читателя в область анализируемых автором проблем.

Материалы и методы исследования подробно изложены в главе 2, которая дает полную информацию о спектре использованных методик и объеме проведенной работы. В данном разделе детально описаны методы выделения фибробластов из биоптатов кожи заушной области с их первичным культивированием и заморозкой для хранения, дана иммунофенотипическая характеристика выделенных фибробластов по анализу поверхностных маркеров, изложены методика фиксации препаратов, их иммуноцитохимического окрашивания и флуоресцентной микроскопии.

В главе 3 представлены собственные результаты исследования и их обсуждение, которые разделены на 4 основных блока:

1. Изучение дозовой зависимости количества фокусов γ H2AX в популяциях фибробластов после воздействия на них рентгеновского излучения в дозах 20, 40, 80, 160, 250, 500 и 1000 мГр при фиксации культур в различные сроки после облучения (15 и 30 мин, 1, 2, 4, 6, 8 и 24 ч). Установлен важный факт, что зависимость между количеством фокусов γ H2AX и дозой рентгеновского излучения (20–1000 мГр) имеет линейный характер. Полученные данные представляют интерес в практическом плане в качестве возможного радиационного биологического маркера для определения поглощенной дозы.

2. Изучение пострадиационного восстановления структуры ДНК от двунитевых разрывов, а также расчет вклада гомологичной рекомбинации в репарацию ДНК от двунитевых разрывов. Эта часть исследования занимает центральное место в диссертационной работе. Установлено, что кинетика репарации двунитевых разрывов ДНК в несинхронизированных фибробластах, подвергнутых облучению в малых и средних дозах ионизирующего излучения, существенно различается. Важной частью исследования также является расчет вклада гомологичной рекомбинации в репарацию двунитевых разрывов ДНК. Полученные данные позволили заключить, что репарация двунитевых разрывов ДНК, индуцированных облучением в малых дозах, является (вставила это слово) более «корректной», по сравнению с действием средних доз. Этот результат имеет наибольшую практическую значимость, при оценке опасности для человека проведения медицинских радиологических процедур.

3. Остаточные фокусы γ H2AX, pATM и Rad51 через 24 ч после облучения фибробластов. На основании полученных экспериментальных данных автор делает вывод, что длительное поддержание повышенного количества радиационно-индуцированных фокусов может быть связано с пролиферативной активностью клеток.

4. Влияние пролиферативной активности клеток на эффективность репарации двунитевых разрывов ДНК. В этом разделе показано, что количество фокусов γ H2AX в пролиферирующих (Ki67+) и находящихся в S/G2 фазах (CENPF+) контрольных и облученных клетках выше, чем число фокусов γ H2AX в непролиферирующих фибробластах (Ki67-) независимо от времени после их облучения. Полученные результаты позволили сделать важный для практической значимости работы вывод о том, что при проведении биодозиметрии или научных исследований необходимо учитывать различия в фоновом количестве фокусов γ H2AX в пролиферирующих и покоящихся клетках.

Полученные результаты сопоставлены с данными литературы. Представленный в этой главе анализ показывает глубокое знание автором

теоретических вопросов по теме диссертационной работы. В разделе «Заключение» кратко изложено основное содержание диссертационной работы, из которого логично вытекают выводы.

В целом, следует отметить стилистические достоинства диссертационной работы, ясное и четкое изложение полученных результатов, адекватные и полностью обоснованные выводы.

Основные результаты диссертационной работы отражены в 4 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций (из них 1 статья в зарубежном журнале) и 7 тезисах докладов, опубликованных в материалах международных и российских конференций. Содержание автореферата отражает основные положения диссертации.

Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет. В работе показано, что облучение фибробластов в малых дозах стимулирует клеточную пролиферацию. Поэтому было бы интересно обсудить возможную связь этого факта с радиационным гормезисом, известным не только для животных, но и для человека.

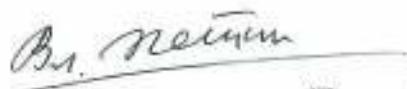
В 1982–1983 гг. источник ^{60}Co (или несколько источников) случайно попал на свалку металлических отходов, которые были переплавлены и из них изготовлены конструкции для строительства домов. В 1983–1984 гг. из них были построены 180 зданий, в которых размещались около 1700 квартир. Первая загрязненная квартира была обнаружена в 1992 г., а затем одна за другой были выявлены и остальные. В этих квартирах проживало и продолжает проживать около 10.000 населения, подвергаясь хроническому облучению. Этот непреднамеренный эксперимент на людях доказал, что хроническое облучение людей могло эффективно снижать выход онкологических заболеваний человека.

Заключение

Диссертационная работа 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», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой дается новое решение актуальной задачи – выявление механизмов клеточного ответа на воздействие редкоизионизирующего излучения в малых (10–100 мГр) и средних (100–1000 мГр) дозах, имеющей существенное значение для радиационной биологии. 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 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Грехова Анна Константиновна заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – Радиобиология.

Официальный оппонент:

Заведующий отделом исследования комбинированных воздействий и биофизической лабораторией Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
 доктор биологических наук, 
 профессор

Петин Владислав Георгиевич

249036, Калужская область, г. Обнинск, ул. Королева, д.4
 Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба –
 филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр
 радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации
 тел.: 8-910-526-67-03 эл.почта: vgpetin@yahoo.com

«20» декабря 2018 г.

Подпись доктора биологических наук, профессора Петина Владислава Георгиевича заверяю:

Ученый секретарь Медицинского радиологического
научного центра им. А.Ф. Цыба –
филиала ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр радиологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
кандидат биологических наук



Печенина Нина Александровна

«20» декабря 2018 г.

