ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 68.1.003.01 (Д 462.001.04), СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ – ФЕДЕРАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ БИОФИЗИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ИМЕНИ А.И. БУРНАЗЯНА», ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 11 ноября 2021 № _7__

О присуждении Салеевой Дарье Владиславовне, гражданке РФ, ученой степени кандидата медицинских наук.

Диссертация «Роль некодирующих РНК в активности генов при действии радиации в нормальных и злокачественных клетках *in vivo* и *in vitro*» по специальности 1.5.1 – Радиобиология принята к защите 12.07.2021 года (протокол заседания №2) диссертационным советом 68.1.003.01 (Д 462.001.04), созданным на базе Федерального Государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» (123182, г. Москва, ул. Живописная, 46; приказ №502/нк от 24.05.2017 г.).

Соискатель Салеева Дарья Владиславовна, 19 марта 1994 года рождения, в 2017г. окончила Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова Медико-биологический факультет по специальности «Медицинская биофизика».

В 2019г. окончила ординатуру в Российском университете дружбы народов по специальности «Врач-рентгенолог» на кафедре Рентгенологии. Кандидатские экзамены сданы.

Работает в должности младшего научного сотрудника в «Государственном научном центре Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» с 2015г. по настоящее время, а также соискатель работает в должности младшего научного сотрудника в «ФБУН Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии» с 2018г. по настоящее время.

Диссертация выполнена на базе лаборатории молекулярной биологии и генетики радиационных эффектов отдела экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины «Государственного научного центра Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна" Федерального медико-биологического агентства.

Научный руководитель – доктор медицинских наук, профессор Засухина Галина Дмитриевна, «Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН», главный научный сотрудник; «Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна», ведущий научный сотрудник.

Научный консультант - кандидат биологических наук Михайлов Владимир Федорович, «Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна», заведующий лабораторией молекулярной биологии и генетики радиационных эффектов.

Официальные оппоненты:

1. Воронина Екатерина Сергеевна, кандидат медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», лаборатория мутагенеза, заведующая лабораторией;
2. Гераськин Станислав Алексеевич, доктор биологических наук, профессор, «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии», лаборатория радиобиологии и экотоксикологии, заведующий лабораторией,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение "Российский Научный Центр Рентгенорадиологии" Министерства Здравоохранения Российской Федерации, в своем положительном отзыве, утвержденном директором ФГБУ «РНЦРР» академиком РАН, профессором Солодким Владимиром Алексеевичем, подписанном Боженко Владимиром Константиновичем, доктором медицинских наук, профессором, Заслуженным врачом России, заведующим отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей, указала, что диссертационная работа

Салеевой Дарьи Владиславовны «Роль некодирующих РНК в активности генов при действии радиации в нормальных и злокачественных клетках *in vivo* и *in vitro*», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.1 – Радиобиология, является законченной научно-квалификационной работой, которая содержит новое решение актуальной научной задачи – изучение комплекса генетических структур (генов и их регуляторов – некодирующих РНК, в частности, днРНК и микроРНК), функции которых могут иметь существенное значение в ответе клетки на облучение, как при действии малых доз радиации, так и при действии высоких доз радиации в нормальных и злокачественных клетках.

Диссертация Салеевой Д.В. соответствует всем требованиям «Положения о порядке присуждении ученых степеней» утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., (с изменениями Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335), а её автор – Салеева Дарья Владиславовна – заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.1 – Радиобиология.

Соискатель имеет 18 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 13 работ, из них в рецензируемых журналах, входящих в базы цитирования ВАК - 10 работ, 3 публикации входят в базы цитирования Scopus и Web of Science, авторский вклад составил 80% от общего объема публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях – 6.5 печатных листа.

1. Saleeva D.V. Changes in the Activity of Genes Involved in the Regulation of Hematopoiesis during Tumorigenesis in Irradiated Mice / Saleeva D.V., Mikhailov V.F., Rozhdestvenskii L.M., Shulenina L.V., Raeva N.F., Zasukhina G.D. // Doklady Biological Sciences. 2020, V. 491, pp. 57–59.
2. Шуленина Л.В. МикроРНК в крови пациентов с раком предстательной железы как возможный показатель ранних осложнений лучевой терапии / Шуленина Л.В, Михайлов В.Ф., Раева Н.Ф., Салеева Д.В., Незнанова М.В.,

Засухина Г.Д. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. 57 (6): 598-607

3. Рождественский Л.М. Оценка влияния противолучевых средств при пролонгированном низкомощностном излучении на экспрессию генов и микроРНК в костном мозге мышей в отдаленный период / Рождественский Л.М., Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В., Раева Н.Ф., Салеева Д.В. // Радиационная биология. Радиобиология. Радиоэкология. 2018. Т.58. №6: 608-618
4. Салеева Д.В. Функционирование регуляторных РНК, влияющих на развитие опухолевых клеток у больных раком гортани / Салеева Д.В., Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В., Бахтин А.А., Акопян К.В., Виноградов В.В., Незнанова М.В., Засухина Г.Д. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия - 2018; 62(4).
5. Михайлов В.Ф. Некоторые аспекты канцерогенеза, связанные с генетическими и эпигенетическими факторами / Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В., Васильева И.М., Салеева Д.В., Засухина Г.Д. // Успехи современной биологии, 2018, том 138, № 5, с. 3–21.
6. Шуленина Л.В. Профили экспрессии генов и некодирующих РНК в биоптатах тканей и клетках крови пациентов с разной патологией после радиационного воздействия / Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Васильева И.М., Салеева Д.В., Незнанова М.В., Засухина Г.Д. // Вестник ВГУ, серия: химия. биология. фармация. – 2019. 1: 103-111.
7. Михайлов В.Ф. Влияние малых доз ионизирующей радиации на экспрессию генов и некодирующих РНК в нормальных и злокачественных клетках человека / Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В., Раева Н.Ф., Васильева И.М., Салеева Д.В., Незнанова М.В., Засухина Г.Д. // Цитология. 2019. 61, № 6, с. 427–438.
8. Mikhailov V.F. The effect of low doses of ionizing radiation on the expression of genes and non-coding RNA in normal and malignant human cells /

Mikhailov V.F., Shulenina L.V., Raeva N.F., Vasilieva I.M., Saleeva D.V., Neznanova M.V., Zasukhina G.D. // Cell and Tissue Biology. 2019.V.13, Pp. 423–433(2019).

9. Шуленина Л.В. Сравнительный анализ длинных некодирующих рнк NEAT1, MALAT1, GAS5, ROR, HOTAIR в крови больных раком простаты до и после лучевой терапии / Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Незнанова М.В., Салеева Д.В., Засухина Г.Д. // Саратовский научно-медицинский журнал 2019; 15 (4): 1004–1008.
10. Салеева Д.В. Анализ изменения активности генов, контролирующих регуляцию гемопоэза при формировании опухолей у облученных мышей / Салеева Д.В., Михайлов В.Ф., Рождественский Л.М., Шуленина Л.В., Раева Н.Ф., Засухина Г.Д. // Доклады академии наук. Науки о жизни. 2020. 491: 168-171
11. Шуленина Л.В. Необходимость стандартизации и валидации метода ПЦР в реальном времени для определения зрелой miR-21 в крови пациентов / Шуленина Л.В., Салеева Д.В. // Медицинская генетика. 2020; 19(12): 66-67.
12. Михайлов В.Ф. Активность генов и некодирующих РНК как подход к определению ранних биомаркеров радиоиндуцированного опухолеобразования у мышей / Михайлов В.Ф., Салеева Д.В., Рождественский Л.М., Шуленина Л.В., Раева Н.Ф., Засухина Г.Д. // Генетика. 2021; 11 – принята к печати.
13. Салеева Д.В. Перспективы применения малых доз радиации в комплексной терапии COVID-19 / Салеева Д.В., Засухина Г.Д. // Вопросы Вирусологии. 2021; 66 - принята к печати.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Ведущей организации - Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение "Российский Научный Центр Рентгенорадиологии" Министерства

Здравоохранения Российской Федерации, замечания носят редакционный характер;

Официального оппонента Ворониной Екатерины Сергеевны, кандидата медицинских наук, заведующей лабораторией мутагенеза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова». Замечания носят рекомендательный характер и не умаляют достоинств диссертационной работы Салеевой Д.В. Отмечено, что диссертация соискателя является законченной научно-квалификационной работой, которая содержит новое решение актуальной научной задачи – изучение комплекса генетических структур (генов и их регуляторов – некодирующих РНК, в частности, днРНК и микроРНК), функции которых могут иметь существенное значение в ответе клетки на облучение, как при действии малых доз радиации, так и при действии высоких доз радиации в нормальных и злокачественных клетках;

Официального оппонента Гераськина Станислава Алексеевича, доктора биологических наук, профессора, заведующего лабораторией радиобиологии и экотоксикологии «Всероссийского научно-исследовательского института радиологии и агроэкологии». Замечания, сделанные в отзыве, не умаляют значимости работы и не отражаются на выводах и основных положениях, выносимых на защиту. Отмечено, что диссертация соискателя является оригинальным законченным исследованием, выполненном на высоком профессиональном уровне; работа содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты, свидетельствующие о личном вкладе автора в науку. В диссертации содержится решение задачи, имеющей важное значение для развития радиобиологии – исследована роль некодирующих РНК в активности генов при действии радиации в нормальных и злокачественно перерожденных клетках.

Получено 7 отзывов на автореферат:

1. ФГБУН Уральского Научно - Практического Центра Радиационной Медицины ФМБА России, подписанный кандидатом биологических наук, И.О. заведующей лабораторией молекулярно - клеточной радиобиологии, Е.А.Блиновой.

Имеются замечания о наличии опечаток и стилистических неточностей. При описании результатов указано что «в опухолях с более агрессивными стадиями заболевания было обнаружение снижение экспрессии гена *PTEN*, что является … маркером для оценки ответа на радиотерапию». Из текста автореферата не понятно, на основании каких данных экспрессия гена *PTEN* может являться маркером для оценки ответа на радиотерапию?

2. Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, подписанный кандидатом биологических наук, заведующим лабораторией радиационной биохимии Александром Евгеньевичем Кабаковым. Имеются замечания в отношении названия работы. В заголовке фигурируют «некодирующие РНК», тогда как в работе исследовались только длинные некодирующие РНК и микроРНК. На самом деле, класс некодирующих РНК существенно шире и включает еще циклические РНК, транспортные РНК, РНК-компоненты рибосом и рибонуклеопротеинов и др. Второе замечание в отношении наличия стилистических ошибок.

3. Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, подписанный главным научным сотрудником, заведующей лабораторией физико-химических проблем радиобиологии и экологии, доктором химических наук Людмилой Николаевной Шишкиной, замечание о не приведённых данных о количестве мышей, использованных в экспериментах по определению выживаемости и результаты этих исследований;

4. Федеральное государственное унитарное предприятие Южно-Уральского института биофизики ФМБА, подписанный заведующей лаборатории радиобиологии, доктором медицинских наук, Валентиной Львовной Рыбкиной, без замечаний;

5. Ереванский государственный институт НАН, подписанный академиком-секретарем отделения естественных наук национальной академии наук Республики

Армения, заведующего кафедрой генетики и цитологии Рубеном Михайловичем Арутюняном, без замечаний;

6. Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, подписанный заведующим лабораторией экологической генетики, доктором биологических наук Рубановичем Александром Владимировичем, без замечаний;

7. Государственное научное учреждение Института радиобиологии Национальной академии наук Беларуси, подписанный заведующей отделом устойчивости биологических систем, кандидатом биологических наук Натальей Владимировной Чуешовой, без замечаний.

Все отзывы на автореферат положительные, критических замечаний не содержат, в них подчеркивается высокий уровень выполнения диссертационного исследования, отмечена актуальность диссертационной работы, практическая значимость, научная новизна. В отзывах указано, что диссертация Салеевой Д.В. является законченной научно-квалификационной работой, написанной на высоком научном уровне и полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждении ученых степеней» утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., (с изменениями Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335), а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.1 – Радиобиология.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их широкой известностью своими достижениями в области радиобиологии, направлением исследований по тематике диссертации, значительным количеством публикаций в соответствующей сфере исследования и способностью определить научную и практическую ценность диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований

Разработаны - новая научная идея:

исследования экспрессии генов и их регуляторов (длинных некодирующих РНК и микроРНК) для оценки риска развития и течения онкологических заболеваний, что может внести существенный вклад в развитие технологий мониторинга и прогнозирования формирования патологических процессов;

положительного влияния малых доз радиации на нормальные клетки, окружающие опухоль, что может помочь в разработке схем радиотерапии онкологических новообразований, за счет активация защитных механизмов в нормальных клетках, окружающих опухоль (на основе активности онкосупрессоров и онкогенов), и отсутствие аналогичных эффектов в злокачественных клетках.

Предложены:

неинвазивный подход оценки экспрессии генов и их регуляторов как биомаркеров патологического процесса, в том числе для прогноза радиоиндуцированного опухолеобразования;

оригинальное научное экспериментальное обоснование применения малых доз радиации для сохранения нормальных клеток перед применением высоких доз радиации в схемах радиотерапии, что вносит существенный вклад для защиты здоровых органов, и элиминации последствий терапии новообразований (фиброзы, циститы, ректиты и др);

Доказаны:

перспективность оценки экспрессии генов как ранних биомаркеров патологического процесса (и прогноза течения);

повышение радиорезистентности нормальных лимфоцитов здоровых доноров и отсутствие отличий в выживаемости клеток линии Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия) после предварительного облучения в малой дозе (0,1 Гр) перед облучением в высокой дозе (5 Гр), сопровождаемые изменением активности генов и их регуляторов;

формирование радиационно-индуцированных опухолей у мышей линии (CBA×C57Bl) F1 к 10 месяцу после воздействия пролонгированного облучения, что сопровождалось подавлением активности как онкосупрессоров, так и онкогенов, и также активация онкогенов через 8 месяцев после облучения, что, вероятно, служило индукцией к формированию злокачественных новообразований;

снижение роста перевивной карциномы Льюиса у мышей линии C57Bl/6 4х-кратно облученных в малой дозе, коррелирующее с повышенной активностью онкосупрессоров и сниженной активностью онкогенов в нормальных тканях этих мышей.

Теоретическая значимость исследования обосновывается тем, что доказаны

снижение роста и объема опухоли у самок-мышей линии C57Bl/6 после 4х-кратного облучения в малой дозе 75 мГр, сопровождающееся активацией онкосупрессоров (гена *P53,* днРНК PINT) и снижением активности ряда онкогенов (гены *CTCF, Cyclin E2*, днРНК MALAT-1 и miR-21) в опухолевых клетках;

статистически значимые различия в чувствительности нормальных и злокачественных клеток человека *in vitro* к действию радиации в малой дозе (0,1 Гр) с последующим воздействием в высокой дозе (5 Гр), что отражалось в повышении выживаемости лимфоцитов здоровых доноров, предварительно облученных в малой дозе, и изменении активации генов (*NFkB, P53*), днРНК (ROR, MALAT1, NEAT1) и микроРНК (miR-27a, miR-107, miR- 181a).

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс генов и их регуляторов в качестве биомаркеров диагностики и прогноза плоскоклеточного рака гортани (гены *PTEN*, *Cyclin E2,* днРНК NEAT1, ROR и miR-27, miR-124);

изложены аргументы применения действия малых доз радиации перед применением высоких доз для схем радиотерапии с целью защиты нормальных клеток, окружающих опухоль;

доказательства снижения роста опухоли у мышей 4х-кратно облученных в малой дозе (75 мГр), отражающиеся в изменении экспрессии ряда генов, днРНК и микроРНК;

доказательства формирования радиоиндуцированных опухолей к 10му месяцу после воздействия пролонгированного облучения, сопровождающиеся активацией онкогенов (*NFkB(p65), IkBα, iNOS, CTCF, TAL1,* NEAT1, miR-125b) через 8 месяцев;

в рамках аналитического исследования раскрыты новые проблемы в области оценки прогноза, развития и диагностики радиоиндуцированных опухолей. Выявлены дискуссионные аспекты влияния малых доз радиации на нормальные ткани, окружающие опухоль;

изучены уровни экспрессии генов и некодирующих РНК, участвующие в процессах развития плоскоклеточного рака гортани;

особенности формирования адаптивного ответа нормальных лимфоцитов здоровых доноров, связанного с уровнем активности генов и некодирующих РНК;

связи развития опухолей у мышей к 10-му месяцу после пролонгированного облучения с изменением активности онкогенов через 8 месяцев после воздействия ионизирующего излучения;

процессы снижения объема опухолей у мышей (трансплантированная карцинома Льюиса) после фракционированного облучения (4х-кратное в дозе 75 мГр) по сравнению с контрольной группой без облучения, которые коррелировали с повышенной активностью исследуемых онкосупрессоров и сниженной активностью онкогенов у облученных мышей.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработан стандарт организации, распространяющийся на технологию определения miR-21 в качестве биомаркера при разработке и совершенствовании профилактики диагностики и лечения лучевых патологий. Документ устанавливает основные требования к технологии процедур, необходимых для определения содержания miR-21 в биоматериале (кровь, органы, клетки, биологические жидкости). Процедура должна удовлетворять требованиям приемлемости, отраженных в ГОСТах и руководствах по аналитической валидации (ГОСТ Р ИСО 5725-6. Использование значений точности на практике) и может быть использован для относительной количественной оценки miR-21 в крови людей (в медицинских учреждениях для диагностики лучевых патологий) и мышей (при планировании экспериментов, связанных с влиянием облучения и диагностике развития радиоиндуцированных опухолей);

определена перспектива применения полученных научных экспериментальных данных в области радиобиологии и медицины для расширения существующих схем радиотерапии опухолей и разработки панелей биомаркеров развития опухолевого процесса;

представлены научно обоснованные решения, которые вносят вклад в развитие существующих подходов к оценке развития и диагностики онкологических заболеваний, которые могут быть учтены при разработке

отечественных и международных нормативных документов в области радиационной медицины.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

достоверность полученных результатов обеспечена использованием сертифицированного оборудования, современных средств измерений высокой точности, проведением большого количества экспериментов с достаточной воспроизводимостью;

полученные уникальные радиобиологические закономерности подтверждаются неоднократной воспроизводимостью результатов, теория построена на известных моделях мышей (C57Bl/6 - 40 особей, (CBA*C57Bl)F1 – 183 особи) и клеточных линиях человека (Jurkat);

статистическая обработка полученных данных проведена с заданной вероятностью, представительными выборочными совокупностями и необходимым количеством повторных исследований посредством современных пакетов статистического анализа (STATISTICA);

выводы диссертации научно обоснованы и согласуются с современными радиобиологическими представлениями в области оценки радиационных эффектов и в области изучения формирования радиационно-индуцированных патологий у человека и животных.

Личный вклад соискателя состоит в выполнении основного объема лабораторных исследований, включая изучение комплекса молекулярно-генетических показателей. Соискатель участвовал на всех этапах исследования: при планировании экспериментов, непосредственном получении исходных данных и научных экспериментах, статистической оценке и интерпретации полученных экспериментальных данных, личное участие в апробации результатов исследования.

Соискателем подготовлены публикации в отечественные и международные профильные журналы, полученные результаты представлены на конференциях регионального, всероссийского и международного уровней. Результаты исследования получены при выполнении государственных контрактов и грантов под руководством научного руководителя и консультанта, включая Государственный контракт с Госкорпорацией «Росатом»; Грант РФФИ.

В ходе защиты диссертации не были высказаны критические замечания.

На заседании 11 ноября 2021 г. диссертационный совет принял решение за разработку научной задачи, имеющей важное значение в радиобиологии – предложены пред клинические исследования применения малых доз радиации при радиотерапии новообразований, перед облучением в высокой дозе радиации, а также рекомендован ряд генов и их регуляторов, имеющих важное значение для оценки прогноза и развития онкопатологий - присудить Салеевой Дарье Владиславовне ученую степень кандидата медицинских наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 8 докторов наук по специальности 1.5.1 – Радиобиология (медицинские науки), участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали за 18, против 1, недействительных бюллетеней нет.

Председатель
диссертационного совета Самойлов Александр Сергеевич

Ученый секретарь
диссертационного совета Шандала Наталия Константиновна

11.11.2021 г.