

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени кандидата
биологических наук Осипова Андрея Андреевича
на тему: «Ранние и отдаленные эффекты воздействия рентгеновского
излучения в фибробластах человека: фокусы белков репарации ДНК,
пролиферация, аутофагия и старение»
по специальности 1.5.1. – Радиобиология**

Актуальность избранной темы

В индустриально развитых странах не менее 50% онкологических больных получают лучевую терапию (ЛТ) в виде основного, адъювантного, неоадъювантного и паллиативного лечения. И нет оснований предполагать, что в дальнейшем роль ионизирующих излучений в лечении злокачественных новообразований будет снижаться, учитывая органосохраняющую направленность радиационного воздействия, которая позволяет добиться выздоровления на фоне хорошей социальной и семейной реабилитации при достаточно высокой противоопухолевой эффективности. Считается, что благодаря технологическому совершенствованию ЛТ, достижение долгосрочной ремиссии заболевания возможно примерно у половины пациентов, но у 5–15% из них развиваются серьезные поздние лучевые осложнения, создающие порой не меньше проблем, в том числе и фатальных, чем прогрессирование новообразования. Тяжесть поздних лучевых осложнений со стороны нормальных тканей со временем возрастает, их крайне сложно лечить и, по сути, хорошим результатом является хотя бы стабилизация процесса. Отсутствие эффективных клинических подходов к лечению в значительной степени связано с недостаточностью радиобиологических знаний о патогенезе поздних лучевых осложнений. Поэтому актуальность исследований в этом направлении не вызывает сомнений, как и актуальность диссертационной работы Осипова А.А., посвященная выяснению закономерностей ответа фибробластов кожи на воздействие рентгеновского

излучения, которое используется в традиционных схемах ЛТ. Выбор объекта исследования также не вызывает вопросов, т.к. одним из основных лучевых осложнений является радиационно-индуцированный фиброз, который вносит значительный вклад в заболеваемость пациентов, может возникнуть в коже и подкожной клетчатке, легких, желудочно-кишечном и мочеполовом тракте, а также в любых других органах в области облучения и, что важно в контексте данной работы, связан с радиационным ответом популяции фибробластов. Более того, по-видимому, фибробласты играют ключевую роль в патогенезе радиационно-индуцированного фиброза среди других клеточных популяций, включая иммунные, эндотелиальные и нормальные стволовые клетки.

Следует отметить, что биологические (в том числе и радиобиологические) свойства тканеспецифических фибробластов могут различаться, и даже фибробласты, находящиеся в различных слоях кожи, обладают различными морфологическими и функциональными особенностями. В нормальной ткани, попавшей в область облучения в ходе ЛТ, со временем обнаруживается гетерогенная популяция фибробластов, состоящая из непосредственно облученных фибробластов, а также фибробластов, мигрировавших из окружающей необлученной ткани, или трансдифференцированных из эндотелиальных клеток, или дифференцированных из циркулирующих мезенхимальных стромальных клеток, или дифференцированных из клеток костного мозга. Конечный эффект в плане развития фиброза будет зависеть от сложного взаимодействия этих субпопуляций фибробластов друг с другом и с другими клетками стромы. Понимание этих взаимосвязей - задача отдаленного будущего, а данная диссертационная работа вносит заметный вклад в решение актуальной проблемы - выяснение закономерностей и некоторых молекулярных механизмов радиационного ответа дермальных фибробластов как часть общей картины патогенеза лучевых осложнений со стороны кожи.

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

Поставленные в работе задачи обоснованы в литературном обзоре, который, с одной стороны, представляет анализ имеющихся данных о пластичности популяции фибробластов, их роли в заживлении раны и патогенезе лучевых осложнений (главным образом фиброза), а, с другой стороны, описывает комплекс процессов, происходящих в клетках в ответ на повреждение ДНК (называемый в англоязычной литературе «DNA damage response – DDR»), включая репарацию повреждений ДНК, гибель, аутофагию, старение, и методы их исследования.

Научные положения и выводы диссертационной работы Осипова А.А. базируются на достаточном экспериментальном материале, который получен автором с помощью адекватных методов исследования, поэтому являются обоснованными и достоверными. В этой связи следует отметить, что работа выполнена на современном методическом уровне, соответствующем мировым стандартам, с использованием методов культивирования клеток в условиях *in vitro*, иммуноцитохимии, флуоресцентной микроскопии в разных спектральных диапазонах, цифрового анализа изображений. По количеству использованных объектов исследования, выполненным независимым экспериментом и повторам, количеству проанализированных клеток, использованию необходимых контролей, адекватных методов статистической обработки исследование соответствует общепринятым нормам и правилам, поэтому надежность полученного экспериментального материала не вызывает сомнений.

Научная новизна результатов исследования и их практическая значимость

Оценивая новизну полученных результатов, можно выделить, по крайней мере, три аспекта. Во-первых, получены новые данные о дозовой зависимости количества фокусов белков репарации ДНК одновременно для 4-х основных классов, участвующих в этом процессе, в разное время после облучения. Во-вторых, для некоторых остаточных фокусов, регистрируемых через 48 и 72 ч

после облучения, впервые установлен дозовый порог, примерно соответствующий величине D_q , вычисляемой по кривой клоногенной выживаемости клеток. В-третьих, впервые показано длительное сохранение повышенного количества фокусов белков репарации ДНК у потомков фибробластов, облученных в дозах 2Гр и 5Гр, что сопровождалось низкой пролиферативной активностью и высокой долей клеток с признаками старения и аутофагии. При облучении фибробластов в малой дозе 0,1Гр этот эффект отсутствовал.

В целом, результаты диссертационной работы представляют не только теоретический, но и практический интерес для дальнейшего развития радиационной биологии и онкологии в плане разработки новых методов защиты нормальных тканей в ходе лучевой терапии и поиска молекулярных мишеней для профилактики и лечения лучевых осложнений.

Оценка содержания и оформления работы

Диссертационная работа написана по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты экспериментов, их обсуждение, общее заключение, выводы и библиографический список, включающий 295 источников. Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста, содержит 33 рисунка и 6 таблиц.

Во введении автором обоснована необходимость изучения ранних и отдаленных эффектов действия рентгеновского излучения на фибробласты, обоснован выбор методов исследования, сформулированы цели, задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, объективно определена научная новизна и практическая значимость работы.

Литературный обзор написан достаточно подробно, содержит анализ современных данных, полученных в последние годы, с вполне уместным упоминанием истории исследования ряда радиационных эффектов и механизмов их возникновения. Однако в этом разделе диссертационной работы

отсутствует заключительная часть, в которой следовало бы систематизировать нерешенные вопросы, выяснению которых посвящено данное исследование.

Материалы и методы исследования изложены в главе 2, которая дает необходимую информацию о спектре использованных методик и большом объеме проведенной работы.

Раздел «Результаты». Центральное место в исследовании занимает крупный массив данных о количестве фокусов белков пострадиационной репарации ДНК, относящихся ко всем 4 функциональным классам: сенсорам, трансдукторам, медиаторам и эффекторам. Причем анализ этих данных проведен в динамике: в непосредственно облученных клетках (в течение 3 суток) и их потомках (в течение 15 пассажей после облучения). В частности, количество белковых фокусов оценивалось на максимуме их выхода (через 0,5 ч после облучения) и в момент окончания быстрой фазы репарации двунитевых разрывов ДНК (через 4 ч после облучения). Остаточные повреждения ДНК, приводящие к репродуктивной гибели, оценивались через 24-72 ч после облучения, а трансгенерационные изменения белковых фокусов, потенциально связанные с генетической нестабильностью, клеточным старением и злокачественной трансформацией, - спустя несколько недель после облучения. Несомненным достоинством диссертационной работы является исследование эффектов в широком диапазоне доз от 0,1 до 10Гр. Особый интерес вызывают результаты облучения в области малых и относительно небольших доз, во-первых, потому что они предоставили возможность оценить наличие порога в радиационном воздействии на фибробласты по критерию остаточных повреждений ДНК и, во-вторых, потому что такому воздействию подвергаются значительные объемы здоровых тканей и органов из-за повсеместного и всё расширяющегося использования технологий облучения с модуляцией интенсивности пучка с характерным высоким градиентом дозы на границе опухолевой мишени. Но безопасность низких лучевых нагрузок на здоровые ткани пока не выглядит очевидной, в связи с чем крайне востребованы фундаментальные исследования в этом направлении. Результаты

количественной оценки фокусов белков репарации ДНК γ H2AX, pATM, 53BP1, p-p53(Ser15) свидетельствуют об отсутствии эффектов облучения в дозе 0,1Гр у потомков облученных клеток и наличии порога в отношении индукции остаточных фокусов γ H2AX и 53BP1 через 48 и 72 ч после облучения. Интересно, что пороговые дозы 0,86 и 0,66 Гр для фокусов γ H2AX, а также 0,87 и 1,05 Гр для 53BP1 в указанные сроки после облучения примерно соответствовали квазипороговой дозе D_q (0,99Гр), определенной по ширине плеча на классическом графике зависимости клоногенной выживаемости от дозы облучения использованной клеточной культуры.

Важно, что в рамках диссертационной работы проведено всестороннее исследование не только процесса репарации ДНК, который хоть и имеет критическое значение для ответа клеток на повреждение ДНК (DDR), но не является единственным. Изучены также и другие важные процессы, которые участвуют в реализации DDR, а именно:

- клеточная гибель (по критериям репродуктивной гибели и экспрессии каспазы-3 - известного маркера апоптоза и регулятора аутофагии, экспрессии LC3-II – маркера аутофагии),
- пролиферация (по экспрессии Ki-67),
- старение (по экспрессии β -галактозидазы).

Как известно, все эти процессы нацелены в конечном итоге на сохранение целостности генома облученных клеток, на предотвращение репликации поврежденной ДНК и передачи её следующему поколению или на элиминацию клеток с потенциально опасными мутациями в качестве защитного механизма от онкогенеза. Регуляция и взаимосвязь этих процессов на тканевом уровне могут иметь важное значение для формирования побочных эффектов ЛТ.

В целом, материалы диссертационной работы хорошо структурированы, полученные данные обработаны с помощью адекватных методов статистического анализа, результаты изложены четко, выводы полностью обоснованы. К оформлению серьезных замечаний нет, хотя обнаружено

небольшое количество опечаток, пропущенные слова и неправильная ссылка на таблицу 6.

Результаты работы отражены в научных публикациях в журналах, включенных в перечень ВАК Минобрнауки РФ, а также индексируемых в базах данных РИНЦ, Web of Science, Scopus (в том числе в журналах 1-2 квартилей), были неоднократно представлены и обсуждены на российских и международных конференциях.

Содержание автореферата отражает основные положения диссертации.

Диссертационная работа Осипова А.А. соответствует специальности 1.5.1. – Радиобиология, а именно следующим её направлениям:

- П.2. Исследование закономерностей биологического ответа на воздействие ионизирующих излучений и разработка эффективных средств и способов управления радиобиологическими эффектами;
- П.4. Механизмы формирования клеточных, молекулярных, генетических изменений в клетках млекопитающих и человека при действии различных видов излучений с разными физическими характеристиками;
- П.5. Молекулярная радиобиология. Механизмы действия ионизирующих излучений на ДНК, РНК, белки и клеточные мембраны; молекулярные механизмы репарации лучевых повреждений; механизмы радиационного гормезиса;
- П.6. Клеточная радиобиология. Механизмы клеточной радиочувствительности и радиорезистентности; модификация радиочувствительности клеток;
- П.7. Фундаментальные и прикладные проблемы дозиметрии радиобиологических эффектов. Количественная оценка биологического действия излучения. Биологическая дозиметрия. Особенности биологического действия малых доз облучения;
- П.8. Радиационная генетика. Влияние ионизирующих излучений на геном, механизмы репарации ДНК; отдаленные последствия действия ионизирующих излучений на геном растений и животных.

Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет, но два вопроса требуют уточнения:

1. Наличие дозового порога установлено для остаточных фокусов белков репарации ДНК γ H2AX и 53BP1 через 48 и 72 ч после облучения. Но всё-таки какая модель, линейная беспороговая или пороговая, лучше описывает экспериментальные данные?
2. Существует ли статистически значимый порог дозы для выявленных клеточных эффектов: радиационно-индуцированного повышения доли стареющих β -галактозидаза позитивных клеток, повышения доли непролиферирующих Ki-67 негативных клеток, повышения доли аутофагических LC3-II позитивных клеток?

Заключение

Диссертационная работа Осипова Андрея Андреевича «Ранние и отдаленные эффекты воздействия рентгеновского излучения в фибробластах человека: фокусы белков репарации ДНК, пролиферация, аутофагия и старение», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.1. - Радиобиология (по биологическим наукам) и критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Осипов А.А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.1. - Радиобиология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор

заведующая отделом радиационной биохимии,
заведующая лабораторией пострадиационного восстановления
Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба —
филиала Федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный медицинский исследовательский центр
радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Замулаева Ирина Александровна

Замулаева

23.08.2024

Контактные данные:

тел.: 7(909)2516710, 7(484)3997188

e-mail: zamulaeva@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 03.00.01 - Радиобиология

Адрес места работы:

249031, Калужская обл., г. Обнинск, ул. Жукова, д.10

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба —
филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр
радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Тел.: 7(484) 3993025, e-mail: mrrc@mrrc.obninsk.ru

Подпись доктора биологических наук, профессора И.А. Замулаевой
удостоверяю

Ученый секретарь Медицинского радиологического
научного центра им. А.Ф. Цыба —

филиала ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр радиологии»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор медицинских наук, профессор



Петров

В.А. Петров

26.08.2024