

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Донова Павла Николаевича

«Полиморфизмы генов, регулирующих иммунный ответ и антиоксидантную систему, как биомаркеры радиочувствительности»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – радиобиология

Актуальность темы. Воздействие ионизирующих излучений (ИИ) на организм человека может приводить к нарушениям на клеточном, тканевом и организменном уровне. В развитии пост-радиационных событий в клетке и организме важную роль играют процессы репарации первичных повреждений ДНК, контроля клеточного цикла, апоптотической элиминации поврежденных клеток, а также система иммунитета и антиоксидантная система. Эффективность и слаженность работы всех этих систем определяет адаптационные ресурсы организма после воздействия ИИ. Среди отдаленных последствий воздействия ИИ генетические эффекты – генные, хромосомные нарушения и радиационно-индуцированная нестабильность генома (РИНГ), представляют особую значимость, поскольку данные нарушения ассоциированы с канцерогенезом. Многочисленные исследования показали, что в отдаленные сроки после воздействия ИИ в геноме облученных лиц сохраняются повышенные уровни генных и хромосомных нарушений.

Сегодня не вызывает сомнения, что индивидуальная радиочувствительность имеет многофакторную природу и, в значительной степени, определяется генетическими особенностями. В связи с индивидуальной радиочувствительностью традиционно рассматриваются гены репарации ДНК, контроля клеточного цикла и апоптоза, гены других метаболических путей и сигнальных каскадов остаются мало изученными в контексте проблемы. В условиях хронического воздействия ИИ иммунная система, наряду с кроветворной, является критической, что обусловлено её

высокой радиочувствительностью и участием в поддержании генетического гомеостаза организма. Хронический окислительный стресс является одним из последствий воздействия ИИ, опосредующих развитие отдаленных эффектов. Таким образом, гены иммунной и антиоксидантной систем организма можно рассматривать как перспективные и мало изученные гены-кандидаты индивидуальной радиочувствительности.

Тема диссертации представляется актуальной с точки зрения перспективы использования полученных результатов в системе предиктивной медицины. Важным также представляется вклад данной работы в развитие радиобиологии в связи с описанием физиологических и молекулярных механизмов формирования радиобиологических эффектов и причин различий их выраженности у разных индивидуумов.

Научная новизна и практическая значимость. В ходе выполнения диссертационной работы получены следующие новые результаты:

- В группе лиц из когорты р. Теча, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, впервые проведен комплексный анализ связи полиморфных вариантов в генах иммунной и антиоксидантной систем, а также демографических и радиационных факторов (доза на ККМ и мощность дозы) с частотой нестабильных ХА лимфоцитов и мутаций Т-клеточного рецептора в отдаленные сроки после воздействия (более 50 лет).

-Впервые показаны ассоциации полиморфных вариантов гена *IL4 rs2070874* – со снижением частоты нестабильных ХА лимфоцитов, а гена *IL12 rs3212227* – со снижением частоты мутаций Т-клеточного рецептора лимфоцитов у изучаемых облученных лиц.

Полученные данные могут быть использованы для оценки индивидуальной чувствительности человека к эффектам хронического облучения населения в диапазонах средних и малых доз. Результаты исследования также вносят вклад в развитие методологии предиктивной радиационной медицины.

Содержание работы. Диссертационная работа Донова П.Н. построена по традиционному плану и состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста и содержит 23 таблицы, 10 рисунков. Список литературы включает 395 источников, из них 48 отечественных и 347 зарубежных.

Во введении четко обоснована актуальность, сформулированы цели и задачи исследования, определены научная новизна и практическая значимость работы.

Глава «Обзор литературы» включает разделы, посвященные описанию критериев радиочувствительности и ассоциативным исследованиям индивидуальной радиочувствительности в связи с генами иммунной и антиоксидантной систем.

В главе «Материалы и методы» отображена характеристика радиационной ситуации на реке Теча, описаны изученные в работе выборки, подробно описаны методы генотипирования и кратко представлены иммунологические методы, методы определения окислительно-восстановительного гомеостаза, а также методы регистрации частоты нестабильных хромосомных aberrаций и мутаций Т-клеточного рецептора. В завершение главы приводится оценка бытовых факторов риска и описание методов и ресурсов, использованных для статистического анализа экспериментальных данных.

Представленные в следующей главе результаты экспериментальных исследований являются компонентами единой исследовательской программы. Работа состоит из двух основных этапов, при этом на первом этапе анализируется связь полиморфных вариантов с радиочувствительностью, измеряемой по уровню нестабильных хромосомных aberrаций и по частоте TCR-мутаций, а на втором этапе, в случае выявления взаимосвязи между данными показателями и определенным генотипом, проводится оценка

показателей иммунитета и системы окислительно – восстановительного гомеостаза у носителей данных генотипов. Все данные представлены достаточно подробно, диссертацию удобно читать и анализировать полученные результаты.

В разделе «Частоты аллелей и генотипов в группе лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию» представлены данные генотипирования выборки по 13 полиморфным сайтам генов иммунной системы и окислительно-восстановительного гомеостаза с указанием частот аллелей, генотипов и соответствия распределения генотипов закону Харди-Вайнберга. Частоты генотипов в изученной группе сравниваются и анализируются в связи с данными литературы для славянской и тюркской подвыборок. В следующих разделах приводятся собственно результаты исследования ассоциации аллелей с хромосомными aberrациями и TCR-мутантными лимфоцитами в имеющейся выборке. В результате выполненных исследований зафиксированы два основных результата: протективный эффект минорного аллеля Т локуса *IL4 rs2070874* относительно повышения частоты нестабильных ХА, и протективный эффект гетерозиготного генотипа А/С по локусу *IL12 rs3212227* относительно повышения частоты TCR-мутантных лимфоцитов.

В следующей главе «Параметры иммунной и антиоксидантной систем у носителей генотипов, ассоциированных с частотой ХА и TCR-мутаций» отражены показатели различных звеньев иммунитета и указан уровень цитокинов в плазме крови у носителей генотипов разных генотипов по локусам *IL4 rs2070874* и *IL12 rs3212227*. У носителей аллеля Т по локусу *IL4 rs2070874*, ассоциированного со снижением частоты ХА, снижено абсолютное количество Т-лимфоцитов, Т-хелперов, В-лимфоцитов, относительное и абсолютное содержание натуральных киллеров – Т-клеток (НКТ-клеток), суммарная лизосомальная активность моноцитов и уровень ИЛ-17, в то время как у носителей генотипа АС по локусу *IL12 rs3212227*, ассоциированного со снижением частоты TCR-мутаций, отмечено снижение доли В-лимфоцитов,

абсолютного количества адгезирующих моноцитов и повышение уровня ИЛ-2 и ИЛ-8. Показатели окислительно – восстановительного гомеостаза не отличались в зависимости от генотипов локусов *IL4 rs2070874* и *IL12 rs3212227*.

Выполненное диссертационное исследование содержит большой массив экспериментальных данных, большую библиографию; представленные таблицы и рисунки информативны, использован достаточно большой арсенал методов и ресурсов для статистической обработки данных; обсуждение содержит литературные данные, на основании которых диссертант предлагает возможные механизмы реализации вовлеченности генов *IL4* и *IL12* в регистрируемые эффекты.

Отмечая несомненную научную ценность и новизну исследования, хотелось бы отметить ряд недостатков, выявленных при прочтении диссертационной работы.

1. Не всегда соблюдается правило написания генетических символов, например, в таблице 2, на страницах 33, 34, 37 для обозначения генов используется обычный шрифт вместо курсива.
2. В разделе «Материалы и методы» отсутствует анализ статистических данных на множественность сравнений. Полученные эффекты для генов цитокинов *IL4 rs2070874* и *IL12 rs3212227* имеют пограничный уровень значимости ($P = 0.039$ и $P = 0.037$) и не проходят проверку на множественность сравнений.
3. Отсутствие других ассоциаций в работе может быть связано не только с отсутствием эффектов, но и с недостаточной статистической мощностью теста. Например, учитывая сравнительно низкую фоновую частоту хромосомных aberrаций, рассмотрение 100 метафаз на человека при анализе нестабильных хромосомных aberrаций могло оказаться недостаточным для фиксации генотипических отличий. Мощность теста в работе не оценивалась.
4. При сравнении частот генотипов в стратифицированных по этнической принадлежности группах показано отклонение от равновесия Харди-

Вайнберга по локусу *IL6 rs1800795* при дозе на ККМ более 1 Гр только у татар и башкир ($p=0,04$). Далее идут рассуждения о возможных преимуществах, которые могут влиять на продолжительность жизни у носителей аллеля G в данной этнической группе. Подобные гипотезы должны строиться на научных фактах.

5. Для анализа ХА было выполнено разделение на две группы (норма и повышенный уровень ХА). В связи с этим возникает вопрос, как определялся порог, то есть, почему норма – это 0 – 0.2 ХА (на 100 клеток), а повышенный уровень – это 0.2 – 3.1 ХА, и к какой группе относили лиц с числом аберраций 0.2.

6. Непонятны различия в подходах к анализу частот ХА и TCR-мутантных лимфоцитов. Если для анализа ХА использовались бинарные показатели » (то есть, «норма» и «выше нормы») и метод «случай-контроль, то для TCR мутантных лимфоцитов оценивалось процентное соотношение числа мутантных клеток у носителей разных генотипов, то есть, предположительно выполнялся линейный регрессионный анализ. Данные подходы не нашли объяснения ни в разделе «Материалы и методы», ни в разделе «Результаты».

7. Следующее замечание носит скорее рекомендательный характер. Интересно было бы оценить корреляции между ХА и TCR-мутантными лимфоцитами в целой группе, в зависимости от дозы облучения, для носителей различных генотипов. В генетических исследованиях небольших выборок можно применять подход так называемых «экстремальных фенотипов», когда сравниваются генотипы лиц с наиболее выраженными фенотипическими признаками. Такой подход было бы интересно применить для генетического исследования людей с одновременно повышенной частотой ХА и TCR-мутантных лимфоцитов.

8. В работе встречаются неудачные формулировки, пропущенные слова. Некоторые примеры:

- в первом предложении Введения на стр. 5, вероятно, имелось в виду «может приводить»;

- на стр. 11 «генов, контролирующих иммунную систему и антиоксиданты»,
правильнее антиоксидантную систему;
- на стр. 55 пропущено слово «описание» во фразе «Краткое методов
представлено ниже».

Тем не менее, перечисленные недостатки и неточности носят частный характер и не влияют на общую высокую оценку представленной работы.

Закключение. Диссертация Донова П. Н. является законченной научно-исследовательской работой, в которой впервые в группе лиц, проживающих в бассейне реки Теча и подвергшихся хроническому радиационному воздействию, проведена комплексная оценка частоты однонуклеотидных полиморфных вариантов большого спектра генов, контролирующих работу иммунной и антиоксидантной систем, частоты нестабильных хромосомных aberrаций и TCR-мутантных лимфоцитов. Также впервые представлены данные, характеризующие состояние как адаптивного, так и врожденного иммунитета и системы окислительно-восстановительного гомеостаза в группе носителей генотипов, ассоциированных с изменением частот нестабильных ХА и TCR-мутантных лимфоцитов. Это позволило автору диссертационного исследования предложить гипотезы возможного механизма, опосредующего влияние полиморфных вариантов генов цитокинов на регистрируемые нарушения. Данное исследование имеет существенное научное и практическое значение для радиобиологии. Основные положения работы опубликованы в научной печати, прошли обсуждение на Международных и Всероссийских симпозиумах и конференциях и вызвали большой интерес у специалистов. Все выводы обоснованы, автореферат отражает основные положения диссертационной работы. Диссертация и автореферат оформлены в соответствии с требованиями ВАК.

По объему исследований и научно-практической значимости работа Донова П. Н. «Полиморфизмы генов, регулирующих иммунный ответ и антиоксидантную систему, как биомаркеры радиочувствительности» отвечает всем требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней»

(Постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года) и требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 - радиобиология.

Главный научный сотрудник лаборатории
экологической генетики Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук, доктор биологических
наук

Сальникова Любовь Ефимовна

Тел.: 8 499 135 11 39 119991, ГСП-1 Москва, ул.

Губкина, д. 3

e-mail: salnikova@vigg.ru

Подпись доктора биологических наук Л.Е.

Сальниковой заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт общей
генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии
наук, доктор биологических наук

Огаркова Ольга Александровна



**Сальникова
Любовь Ефимовна**



**Огаркова Ольга
Александровна**

Председателю
диссертационного совета Д. 501.001.65
д. физ.-мат. наук, профессору Черняеву А. П.
от д.б.н. Сальниковой Л.Е.

Заявление

Я, Сальникова Любовь Ефимовна, доктор биологических наук (шифр специальности 03.01.01), главный научный сотрудник лаборатории экологической генетики ИОГен РАН согласна быть оппонентом Донова Павла Николаевича по кандидатской диссертационной работе на тему «Полиморфизмы генов, регулирующих иммунный ответ и антиоксидантную систему, как биомаркеры радиочувствительности» по специальности 03.01.01 - Радиобиология.

Список работ основных работ по теме диссертации прилагается.

Подпись
удостоверяю

Ученый секретарь
доктор биологических наук



Огаркова О.А.
Огаркова О.А.

Сведения об учреждении, где работает оппонент:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН)
Почтовый адрес (официальный): 119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д. 3
E-mail: iogen(at)vigg.ru
Тел.: (499) 135-62-13, Факс: (499) 132-89-62
E-mail _ salnikovalyubov@gmail.com
Сайт института: <http://vigg.ru/institute/kontakty>

Список работ оппонента д.б.н. Л.Е. Сальниковой за последние пять лет, соответствующие тематике оппонируемой диссертации

№	Название статьи	Выходные данные Журнал, год, номер, стр.
1.	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.
2.	Солтаева А.М.Х., Джамбетова П.М., Сальникова Л.Е., Рубанович А.В., Абилов С.К. Связь полиморфных вариантов генов детоксикации ксенобиотиков SOD 2 и CAT с частотой микроядер у детей	Известия Кабардино-Балкарского научного центра РАН. -2013. -№ 1 (51). -С. 201-205
3.	Sal'nikova L.E., Chumachenko A.G., Vesnina I.N., Lapteva N.S., Kuznetsova G.I., Abilev S.K., Rubanovich A.V. Analysis of genotypic dependence of chromosome aberration frequency in human lymphocytes irradiated in vivo and in vitro	The Lessons of Chernobyl: 25 Years Later Burlakova E.B., Naidich V.I. Moscow, 2012. - С. 157-163.
4.	Белопольская О.Б., Рубанович А.В. Сальникова Л.Е., Чумаченко А.Г. Correlations between DNA polymorphism and frequencies of gamma-radiation induced and spontaneous cytogenetic damage	Health physics. - 2012.- № 1.- T.103.- С. 37 - 41
5.	Сальникова Л., Чумаченко А., Лаптева Н.Ш. Аллельные варианты полиморфных генов, сопряженные с повышенной частотой хромосомных aberrаций	Генетика. -2011. -Т. 47. -№ 10.- С. 117.
6.	Абилов С.К., Сальникова Л.Е., Рубанович А.В. Исследование ассоциации радиочувствительности хромосом человека с полиморфизмом генов-кандидатов при воздействии γ -излучения in vivo и in vitro	Гигиена и санитария. -2011.- № 5.-С. 14-18.
7.	Sal'nikova L.E., Chumachenko A.G., Vesnina I.N., Lapteva N.S., Kuznetsova G.I., Abilev S.K., Rubanovich A.V. Polymorphism of repair genes and cytogenetic radiation effects	Biophysics. - 2011. -Т. 56. - № 2.- С. 358-363.

Главный научный сотрудник
Лаборатории экологической генетики
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института общей генетики
им. Н.И. Вавилова Российской академии наук
доктор биологических наук
Сальникова Любовь Ефимовна

Подпись
удостоверяю

Ученый секретарь
доктор биологических наук

Огаркова О.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН)

Почтовый адрес (официальный): 119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д. 3

E-mail: iogen(at)vigg.ru

Тел.: (499) 135-62-13, Факс: (499) 132-89-62