

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



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

ул. Губкина, д. 3, г. Москва, ГСП-1, 119991
Тел.: (499) 135-62-13, (499) 135-20-41
Факс: (499) 132-89-62

E-mail: iogen@vigg.ru
<http://www.vigg.ru>

08.11.2022 № 92 - 02-13 / 462

На № _____

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИОГен РАН

член-корр. РАН

 А.М. Кудрявцев

8.11.2022 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН» на диссертационную работу Савченко Ренаты Ренатовны «Роль генов *ADAMTS1* и *THBS1* в радиационно-индуцированном ответе соматических клеток человека на повреждение ДНК», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика

Актуальность темы выполненного исследования

Проблема генетической детерминации радиочувствительности вызывает значительный интерес в связи с нуждами радиотерапии и профессионального отбора в космонавтике и атомной промышленности. Первоначально поиск генов, вовлечённых в контроль радиочувствительности, проводился в основном среди генов репарации ДНК, детоксикации ксенобиотиков и контроля клеточного цикла. Эти исследования не выявили значительных эффектов, позволяющих прогнозировать индивидуальную чувствительность человека к воздействию ионизирующего излучения. Дальнейшие исследования с использованием GWAS и анализа экспрессии генов выявили возможную причастность генов внеклеточного матрикса (BKM), не имеющих прямого отношения к репарации ДНК. В частности, была выявлена дифференциальная экспрессия генов *ADAMTS1* и *THBS1* у индивидов с различной радиочувствительностью.

В связи с этим диссертационная работа Савченко Ренаты Ренатовны, посвящённая исследованию влияния дифференциальной экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* на формирование радиационно-индуцированного ответа соматических клеток человека на повреждение ДНК,

несомненно, является актуальным и перспективным и имеет большое научно-практическое значение для современной радиационной генетики.

Научная новизна

Впервые для изучения радиочувствительности соматических клеток человека созданы клеточные линии HeLa с дифференциальной экспрессией генов *BKM ADAMTS1* и *THBS1*. С помощью этих модельных систем удалось установить, что нокаут генов *ADAMTS1* и *THBS1* влияет на жизнеспособность клеток, частоту радиационно-индуцированных микроядер (МЯ) и уровень экспрессии многих других генов, в том числе связанных с клеточным ответом на облучение.

Основные результаты и их достоверность

Цель диссертационной работы Р.Р. Савченко заключалась в установлении влияния дифференциальной экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* на формирование радиационно-индуцированного ответа соматических клеток человека на повреждение ДНК. В этой связи следует отметить, что замысел работы полностью соответствует классической схеме: сначала научная гипотеза, затем эксперимент, направленный на её проверку. Это важно, поскольку очень многим современным научным исследованиям свойственен изъян под названием HARKing (Hypothesizing After Results are Known или апостериорная формулировка гипотез). Новейшие омиксные технологии породили экспериментальные планы с огромным количеством независимых, предикторных или группирующих переменных по принципу «мерьте всё, потом разберёмся». В результате широко распространилось такое опасное явление, как p-hacking. Имеется в виду сознательное или бессознательное «натягивание» статистической значимости в условиях существенной множественности сравнений. Автор отзыва полагает HARKing и p-hacking основными причинами чрезвычайно низкой воспроизводимости результатов современных биомедицинских исследований, публикуемых в рейтинговых журналах.

Представленное исследование очевидно свободно от этого недостатка. Работу Р.Р. Савченко отличает чёткая постановка задачи, исходящая из полученных ранее данных о дифференциальной экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* в лимфоцитах здоровых индивидов с различной радиочувствительностью (С.А. Васильев, 2018). Последовательно изучены все варианты целевого изменения экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1*: нокаут (редактирование генома CRISPR/Cas9), сверхэкспрессия (плазмидная трансфекция) и восстановленная экспрессия в клеточных линиях с нокаутом. Во всех случаях оценивались выживаемость клеток при облучении в диапазоне 0-8 Гр, уровни фокусов белков репарации и частота МЯ. Кроме того, проведён микроматричный анализ экспрессии других генов на фоне нокаута *ADAMTS1* и *THBS1*. Работы проводились на опухолевой клеточной линии HeLa, но дополнительно был проведён анализ корреляции экспрессии изучаемых генов с эндогенным уровнем фокусов белков репарации ДНК и частотой радиационно-индуцированных МЯ в лимфоцитах периферической крови здоровых индивидов. Показано, что

нокаут *THBS1* снижает выживаемость клеток HeLa до облучения, а нокаут гена *ADAMTS1* – после воздействия γ -излучения в дозе 2 Гр (в 1,9 раз, $p < 0,05$). При этом нокаут генов *ADAMTS1* и *THBS1* не влияет на уровень фокусов белков репарации ДНК γ H2AX и 53BP1. Сверхэкспрессия *THBS1* приводит к возрастанию уровня эндогенных фокусов 53BP1 на клетку и колокализованных фокусов 53BP1 и γ H2AX, однако сверхэкспрессия *ADAMTS1* не влияет на уровень фокусов белков репарации ни до, ни после облучения.

Нокаут *ADAMTS1* и *THBS1* приводит к росту радиационно-индуцированных МЯ. При этом восстановление экспрессии исследуемых генов линиях с нокаутом приводит к снижению частоты МЯ до значений, характерных для контрольной клеточной линии HeLa.

Нокаут гена *ADAMTS1* приводит к изменению экспрессии 12 генов до облучения и 16 генов после облучения в дозе 2 Гр, а нокаут гена *THBS1* – к изменению экспрессии 3 генов до облучения и 3 генов после облучения в дозе 2 Гр. Среди выявленных дифференциально экспрессирующихся генов 53 % генов связаны с радиационно-индуцированным клеточным ответом.

Отмечается отсутствие корреляции экспрессии *THBS1* с частотой центромеро-негативных МЯ в лимфоцитах здоровых индивидов ни до, ни после облучения.

Достоверность полученных результатов гарантирована использованием исключительно широкого диапазона современных молекулярно-генетических и биоинформационных методов исследования, а также адекватной статистической обработкой полученных результатов.

Общая характеристика работы

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе Р.Р. Савченко, основаны на большом экспериментальном материале и вытекают из полученных результатов. Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста и включает введение, основные главы (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты и обсуждение), выводы, список сокращений, список литературы, список иллюстративного материала и 2 приложения. Работа иллюстрирована 32 рисунками и 10 таблицами. Библиография включает 252 литературных источника, из них 19 источников отечественной литературы, 227 источников зарубежной литературы и 6 интернет-ресурсов.

В обзоре литературы полно и всесторонне проанализировано современное состояние исследований в области молекулярной радиобиологии, включая изменения паттерна экспрессии генов. Рассмотрены ключевые генные сети и их влияние на развитие эффектов после облучения. На основе этого соискателем было выбрано направление собственной работы, объекты, гены-кандидаты и соответствующие методы исследования.

Методический уровень работы соответствует мировому по использованию современных технологий, объектов исследования и методов статистического анализа данных. Исследование проводилось в соответствии с требованиями этических положений и национальных рекомендаций,

определяющих характер и объём получения биологического материала. Результаты исследования изложены логично, хорошо проиллюстрированы.

В заключении соискатель даёт анализ полученных данных, сравнивает их и уже имеющимися данными литературы и обсуждает теоретическую и практическую значимость результатов проделанной работы. Обсуждение результатов выполнено на основании современных представлений по изучаемой проблеме, в списке использованной литературы представлены свежие зарубежные и российские источники научной информации. На основании этого, можно утверждать, что работа носит высокую степень новизны.

Выводы, представленные в работе, обоснованы и планомерно вытекают из поставленных задач, которые соответствуют основной цели исследования. Достоверность полученных результатов подтверждена высоким методическим уровнем проведенных исследований и качественной статистической обработкой полученных результатов. Выносимые на защиту положения в полной мере изложены в оригинальных статьях в рецензируемых научных журналах. По материалам работы опубликовано 4 статьи в российских изданиях, рекомендованных ВАК. В 3 из 4 опубликованных статей по теме диссертационного исследования Р.Р. Савченко является первым автором, что свидетельствует о решающем вкладе соискателя в анализ и обобщение данных, формулировку положений и выводов, написание и публикацию работ.

Автореферат имеет традиционную структуру, содержит все необходимые разделы и отражает основные результаты диссертационной работы.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы

В работе показано участие генов *ADAMTS1* и *THBS1* в формировании радиационно-индуцированного клеточного ответа. Созданные модельные системы могут быть использованы в исследованиях клеточных и молекулярных механизмов формирования радиочувствительности. Показано, что гены *ADAMTS1* и *THBS1* могут представлять интерес с точки зрения разработки таргетных молекулярных ингибиторов для повышения радиочувствительности опухолевых клеток.

Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы

Полученные результаты и предложенные методические схемы могут быть использованы для постановки принципиально новых экспериментов, направленных на изучение механизмов радиационного поражения. Результаты исследования могут быть востребованы в высших учебных заведениях и на кафедре военной токсикологии и медицинской защиты Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова (Санкт-Петербург), для использования в условиях клиники в Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба (г. Обнинск) и ФГУ Российском Научном Центре рентгенорадиологии Минздрав РФ, (г. Москва).

Замечания

Фактически замечаний к работе нет. Диссертация написана предельно ясно, хорошо структурирована и доходчиво иллюстрирована. Имеются незначительные замечания редакционного характера. В таблице A1 перечислены гены, изменяющие экспрессию в клеточной линии HeLa с нокаутом *ADAMTS1* (значимость $p < 0,05$). Однако для многих генов из этой таблицы $p > 0.1$. В сноске таблицы указано, что полужирным начертанием выделены гены, изменяющие экспрессию при $FDR < 0,05$. При этом выделен ген *POPDC3* (2 Гр), для которого $p\text{-value} = 0.053$. В аналогичной таблице для клеток с нокаутом *THBS1* соответствующая колонка имеет другой заголовок « $p\text{-value (FDR)}$ », хотя указаны явно только $p\text{-values}$.

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

Заключение

Диссертация Савченко Ренаты Ренатовны «Роль генов *ADAMTS1* и *THBS1* в радиационно-индуцированном ответе соматических клеток человека на повреждение ДНК», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика, является самостоятельной научно-квалификационной работой и полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в редакции постановления Правительства РФ от 01.10.2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор достоин присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика .

Диссертационная работа Р.Р. Савченко, автореферат и отзыв на данную работу рассмотрены и обсуждены на заседании семинара отдела генетической безопасности Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук», протокол № 9 от 01.11.2022 г.

Отзыв подготовил:

Заведующий лабораторией экологической генетики

Федерального государственного бюджетного

учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова

Российской академии наук,

доктор биологических наук Александр Владимирович Рубанович,

119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, д. 3, моб.: +7 (916) 123-62-42

E-mail: rubanovich@vigg.ru

Подпись д.б.н. Рубановича А.В. удостоверяю

Учёный секретарь ИОГен РАН, д.б.н.



_____ А.В. Рубанович

_____ И.И. Горячева