

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук Баклаушева Владимира Павловича на диссертационную работу **Риттера Генриха Сергеевича** по теме: «Изучение клеточных и молекулярных механизмов радиопротекторного действия двуцепочечной РНК *Saccharomyces cerevisiae*», представленную в диссертационный совет 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология

### **Актуальность избранной темы диссертации**

Проблема химической защиты организма от воздействия ионизирующей радиации возникла в середине 40-х годов двадцатого столетия после использования атомного оружия для бомбардировки японских городов Хиросима и Нагасаки. Это событие послужило поводом к интенсивному развитию радиобиологических исследований во всем мире. Новым толчком для развития радиобиологии на современном этапе и в будущем является необходимость защиты космонавтов от космических лучей в процессе готовящихся полётов в дальний космос.

Впервые возможность снижения лучевого поражения у млекопитающих с помощью серосодержащих соединений была показана в 1949 г. Харви Паттом и др. при применении цистеина. В то же самое время был выявлен противолучевой эффект у фармакологических соединений, вызывающих гипоксическое состояние организма. В 70-е годы поиск радиопротекторов завершился открытием наиболее эффективных к настоящему времени противолучевых соединений. Это относится, прежде всего, к серосодержащему препарату американской разработки «WR-2721» и препарат Московского химико-технологического института «Б-190», вызывающего локальную гипоксию.

Несмотря на выраженные радиозащитные свойства и удовлетворительную переносимость, штатные радиопротекторы имеют ряд недостатков. К ним относится короткая продолжительность действия, что не позволяет обеспечить человеку длительную радиозащиту и неэффективность при длительной экспозиции малыми дозами ионизирующего излучения, т.е. как раз в условиях длительных пилотируемых космических полётов. В связи с этим поиск и создание новых высокоэффективных, безопасных и удобных в применении препаратов для защиты от радиационных поражений является актуальной проблемой современной науки.

Диссертационное исследование Риттера Генриха Сергеевича является значимым, актуальным и перспективным, так как посвящено изучению и характеристике нового радиопротекторного соединения, основанного на

двучепочечной РНК, выделенной из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, и обладающего, судя по всему, оригинальным механизмом действия, высокой эффективностью и более широким терапевтическим диапазоном, чем у применяемых в настоящее время штатных радиопротекторов.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Исследования, на основе которых написана диссертация Риттера Генриха Сергеевича, проведены на высоком методологическом уровне, с использованием большого количества молекулярных, цитологических и генетических методов исследования. Все представленные выводы логически обоснованы и экспериментально подкреплены. Положения, выносимые на защиту в полной мере отражают важные достижения диссертационной работы Генриха Сергеевича и демонстрируют, что двучепочечная РНК, полученная из тотальной РНК дрожжей *S. cerevisiae*, при внутривенном введении экспериментальным мышам, достигает внутренних компартментов гемопоэтических стволовых клеток в не деградированной форме, и, в случае последующего облучения животного летальной дозой радиации, способствует сохранению жизнеспособности этих клеток, а так же индуцирует их пролиферацию и выход в кровоток. Гемопоэтические стволовые клетки, циркулирующие в кровотоке и сохранившие жизнеспособность после облучения, фиксируются в опустошенной паренхиме селезенки, где образуют герминативные центры пролиферации форменных элементов крови, обеспечивающие быстрое восстановление популяции клеток иммунной и кроветворной систем. Двучепочечная форма и открытые концы молекул являются факторами, определяющими радиопротекторный эффект дцРНК, при ее взаимодействии с низкодифференцированными предшественниками гемопоэтических клеток крови, в частности, с-Kit/CD34.

### **Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций**

В ходе исследования Генрих Сергеевич смог определить активную субстанцию нового радиопротекторного препарата и установить терапевтическую широту его применения. Было положено начало изучению клеточного и молекулярного механизма радиопротекторного действия препарата РНК, в результате чего, было получено множество новых экспериментальных данных относительно поведения экзогенной двучепочечной РНК в организме животных.

Выводы и основные положения диссертационной работы подкреплены достоверными результатами. Во многих случаях результаты получены несколькими независимыми путями.

Все результаты работы подробно изложены в 12 публикациях: из них 5 опубликованы в журналах, входящих в международную базу цитирования, 6 публикация в сборниках тезисов и 1 зарегистрированный патент.

### **Научная новизна исследований и практическая значимость выводов и рекомендаций**

Научная новизна диссертационного исследования заключается в том, что впервые была дана характеристика двуцепочечной РНК как радиозащитному препарату экстренного действия. Было показано, что двуцепочечная РНК не деградирует в кровотоке живой мыши, и то, что она способна естественным механизмом интернализироваться в ядро стволовой клетки. Были получены первые экспериментальные данные, указывающие на механизм радиопротекторного действия нового препарата.

Практическая значимость проведенного исследования заключается в том, что по-сути проведены доклинические испытания (ДКИ) в формате PoC (proof of concept) нового радиопротекторного препарата, стимулирующего гемопоэз и превосходящего по своим защитным свойствам штатный радиопротектор Б-190. Эти данные могут быть положены в основу регламентных ДКИ нового препарата, на основании которых потенциальный высокоэффективный радиопротектор может быть внедрен в практическую радиационную медицину.

### **Соответствие диссертации и автореферата критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней»**

Диссертация и автореферат соответствуют критериям «Положения о присуждении ученых степеней». Диссертация Риттера Генриха Сергеевича обладает внутренним единством и содержит новые научные результаты и положения, выносимые на защиту, а именно:

1. Двуцепочечная РНК (дцРНК), полученная из тотальной РНК дрожжей *S. cerevisiae*, при внутривенном введении экспериментальным мышам, достигает внутренних компартментов гемопоэтических стволовых клеток в не деградированной форме, и, в случае последующего облучения животного летальной дозой радиации, способствует сохранению жизнеспособности этих клеток, а также индуцирует их пролиферацию и выход в кровоток.

2. Гемопоэтические стволовые клетки, циркулирующие в кровотоке и сохранившие жизнеспособность после облучения, фиксируются в опустошенной паренхиме селезенки, где образуют герминативные центры пролиферации форменных элементов крови, обеспечивающие быстрое восстановление популяции клеток иммунной и кроветворной систем.

3. Двухпочечная форма и открытые концы молекул являются факторами, определяющими радиопротекторный эффект дцРНК, при ее взаимодействии с низкодифференцированными предшественниками гемопоэтических клеток крови, в частности, c-Kit/CD34.

Автореферат содержит основные разделы диссертации и раскрывает ее научные положения. Выводы и заключение, изложенные в автореферате и диссертации, идентичны.

### **Полнота опубликованных результатов**

Результаты исследований были представлены и обсуждены на таких научных конференциях, как Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (г. Санкт-Петербург, 2022), Международная научная студенческая конференция (г. Новосибирск, 2021), Международная научная студенческая конференция (г. Новосибирск, 2022), Четвертый междисциплинарный научный форум с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии» (г. Москва, 2018), V Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (г. Новосибирск, 2018), XX Всероссийская молодёжная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии (г. Владивосток, 2023).

Всего соискателем по теме диссертации было опубликовано 5 научных работы в таких журналах, рецензируемых в базах данных «Скопус» (Scopus) и «Сеть науки» (Web of Science), как «Вавиловский журнал генетики и селекции», «International Journal of Radiation Biology», «Frontiers in Genetics», «International Journal of Radiation Research», «International Journal of Molecular Sciences».

Публикации соответствуют материалам, представленным в диссертации. Помимо публикаций в научной печати по теме диссертации зарегистрирован один патент на изобретение под номером RU 2701155 C1.

### **Оценка личного вклада соискателя в разработку научной проблемы, репрезентативность эмпирического материала**

Диссертационная работа написана понятным научным языком и выполнена на высоком научном и методическом уровне.

В рамках выполнения научно- квалификационной работы Риттер Г.С. провел анализ литературы, обозначил проблематику, определил цель и задачи для её решения, провел комплексную экспериментальную работу, анализировал результаты и сформулировал выводы. Все работы были выполнены автором самостоятельно, либо при непосредственном его участии.

### **Оценка содержания и завершенности диссертации**

Диссертационная работа Риттера Генриха Сергеевича изложена на 129 страницах компьютерного текста и включает следующие разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список литературы. Диссертация содержит 6 таблиц и 46 рисунков. Список использованной литературы включает 176 источников.

В разделе «Введение» представлены сведения об актуальности работы и степени её разработанности, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, цель и задачи исследования.

В разделе «Обзор литературы» собраны и структурированы, имеющиеся на настоящее время, литературные данные по исследуемой теме. Автор описывает общие молекулярные и клеточные механизмы радиационного поражения живых организмов и механизмы действия существующих на данный момент радиозащитных соединений. В частности, он выделяет ядерный хроматин как лимитирующий фактор выживаемости клеток и организма в целом. Дает подробное описание путей репарации двуцепочечных разрывов ДНК, в том числе при помощи экзогенных нуклеиновых кислот.

Раздел «Материалы и методы» автор детально описывает использованные в работе материалы и методы, включая методы визуализации и статистической обработки полученных данных.

Раздел «Результаты» описывает логику и ход исследовательской работы. Результаты поделены на 4 тематические части: «1. Поиск и характеристика активной субстанции препарата суммарной РНК дрожжей, определяющей ее радиозащитные свойства», «2. Поиск и характеристика клеточной мишени, воздействие на которую обуславливает радиозащитный эффект дцРНК, выделенной из дрожжей *S. cerevisiae*. Модель радиопротекторного действия препарата дцРНК», «3. Доказательство интенсификации фрагментов дцРНК в эукариотическую клетку. Экстраполяция данных на ГСК», «4. Предположительная модель участия молекул дцРНК в репарации аварийных и сложных двуцепочечных разрывов». Мне очень

понравилось, что каждый подраздел «Результатов» заканчивается лаконичным заключением, это говорит о структурности мышления диссертанта и очень помогает в восприятии материала.

В разделе «Обсуждение результатов» идет обобщение собственных результатов и их анализ в контексте соответствующих литературных данных.

В разделе «Заключение» автор обобщает и структурирует полученные результаты. Диссертацию завершают развернутые и конкретизированные выводы, соответствующие поставленным задачам и полученным результатам.

## Вопросы и замечания

Диссертационная работа Г.С. Риттера производит очень благоприятное впечатление и по совокупности научно-практической ценности, безусловно, заслуживает самой высокой оценки. Вместе с тем, считаю целесообразным задать ряд вопросов и обратить внимание на некоторые замечания.

1. Во введении обзора при описании основных этапов развития радиационного поражения смешаны клинические проявления острой и хронической лучевой болезни. Поражение костного мозга, лимфопения, иммунодефицит и развитие оппортунистической инфекции – признаки ХЛБ. Эндокринные нарушения, поражение ЦНС, кишечника, развитие полиорганной недостаточности – признаки острой лучевой болезни.
2. С какой целью при проведении иммуноцитохимического окрашивания антителами к модифицированному гистону  $\gamma$ H2AX в рабочий раствор добавляли 10% (!) эмбриональной бычьей сыворотки? (по-моему, это крайне расточительно и не имеет смысла, потому что неспецифические центры связывания Ат надо забивать сывороткой животного, в котором сделаны вторичные Ат).
3. В работе сделано большое количество различных экспериментов на животных. Подробная схема проведенных экспериментов существенно упростила бы процесс понимания дизайна исследований.
4. На рисунках, показывающих кривые выживания (Рис. 8, 15, 22, 42 и др.) следовало бы представить кривые Каплана-Майера с указанием достоверности различий. Кривые выживания, построенные на основании групп из 5 мышей представляются недостаточно репрезентативными. Мне в целом не хватило данных статистического анализа кривых выживания во всей работе. Считаю, что строить кривые выживания в Экселе – моветон, существует множество специфических пакетов для функции Каплана-Майера.
5. Согласно гипотезе исследования, радиопротекторное действие дцРНК опосредуется путём выживания CD34+ ГСК, что препятствует истощению костного мозга после облучения. При этом, оценка относительного содержания клеток лейкоцитарной формулы не дала никаких достоверных отличий между опытными группами (применение 200 и 400 мкг дцРНК) и контролем (Рис. 23, Табл. 5). Почему не смотрели абсолютное содержание лейкоцитов, лимфоцитов и моноцитов?
6. Как радиопротекторный эффект дцРНК соотносится с выявленной мутагенной активностью дцРНК в отношении клеток костного мозга? Не является ли последняя противопоказанием для дальнейшей разработки нового лекарственного препарата на основе дцРНК?

7. Если радиопротекторный эффект дцРНК, введенной через час после облучения (на пике формирования ДЦР) меньше, чем эффект дцРНК, введенной через 4 часа (Рис. 42, 43), не значит ли это, что ее радиопротекция никак не связана с улучшением репарации ДНК?
8. В итоге, каков молекулярный механизм интернализации дцРНК - Клатрин или кавеолин зависимый, или какой-то ещё? Из представления результатов эксперимента с ингибиторами эндоцитоза следовало бы убрать концентрации жирорастворимых ингибиторов (хлорпромазин), перфорирующих клеточную мембрану, представлять такие данные не имеет смысла.
9. Почему для ключевого эксперимента по сравнению радиопротекторного эффекта РНК с Б-190 выбрана суммарная РНК, а не дцРНК?
10. Почему для сравнительного эксперимента по радиопротекции Б-190 и дцРНК не объединены все данные по выживаемости после введения РНК, а представлены группы  $n = 9$ ?
11. Нетривиальный и пространственный дизайн третьего вывода, на мой взгляд, несколько снижает уровень эстетического удовольствия от работы. Я бы сформулировал третий вывод более лаконично, чтобы не повторять Положения, вынесенные на защиту и полностью соответствовать третьей задаче. Какое отношение к механизму действия дцРНК имеет то, что они не деградируют в кровотоке в течение часа? Это фармакодинамика будущего препарата. «Спасённые ГСК» - не вполне уместная для Выводов спекуляция.
12. В работе заметны досадные опечатки. Досадны они тем, что диссертация была готова в августе 2023 года и у автора было достаточно времени для вылавливания «блох».

Следует подчеркнуть, что все вышеперечисленные замечания носят дискуссионный характер, не являются принципиальными и никак не снижают научную и практическую значимость диссертационной работы.

### **Заключение**

Диссертация Риттера Генриха Сергеевича по теме: «Изучение клеточных и молекулярных механизмов радиопротекторного действия двуцепочечной РНК *Saccharomyces cerevisiae*», представленная в диссертационный совет 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология, является законченной научно-квалификационной работой, выполненной автором самостоятельно, на высоком методическом уровне.



Представленная диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.22. – Клеточная биология и имеет научное и практическое значение для радиобиологии и медицины.

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 18.03.2023 г.), а её автор Риттер Генрих Сергеевич заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук,  
заместитель генерального директора по  
научной работе в ФГБУ «Федеральный  
центр мозга и нейротехнологий ФМБА России»

Баклаушев В. П.

«21» ноября 2023 г.

Контактные данные:

тел.: +7(926)983-88-65, e-mail: serpoff@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:

30.05.01. – Медицинская биохимия

Адрес места работы:

117513, Москва, ул. Островитянова, д. 1, стр. 10. Федеральное государственное  
бюджетное учреждение федеральный центр мозга и нейротехнологий  
Федерального медикобиологического агентства (ФГБУ «ФЦМН» ФМБА) России.

