

Отзыв

официального оппонента доктора биологических наук С.А. Васильева на диссертационную работу Риттера Генриха Сергеевича "Изучение клеточных и молекулярных механизмов радиопротекторного действия двуцепочечной РНК *Saccharomyces cerevisiae*", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология

Выявление факторов, позволяющих модифицировать влияние ионизирующего излучения на живые организмы, остается важной проблемой радиобиологии, клеточной биологии и генетики. Исследованию этого актуального вопроса посвящено диссертационное исследование Риттера Генриха Сергеевича "Изучение клеточных и молекулярных механизмов радиопротекторного действия двуцепочечной РНК *Saccharomyces cerevisiae*", представленное на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология.

Структура диссертационной работы. Диссертация оформлена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 128 страницах, богато иллюстрирована, содержит 46 рисунков и 6 таблиц. Список цитируемой литературы включает 176 источников. Однако только 9 литературных источников являются работами последних 5 лет (2019-2023 годы), из них 3 являются собственными работами автора.

Во **Введении** обосновывается актуальность исследования, формулируются цель и задачи диссертационной работы, указывается ее научная новизна, а также теоретическая и практическая значимость полученных результатов. Центральной идеей работы явилось изучение механизмов радиопротекторного действия РНК *Saccharomyces cerevisiae*.

Реализация идеи, лежащей в основе исследования, потребовала решения задач, сфокусированных на оценке временных параметров радиопротекторного действия препарата РНК, полученного из пекарских дрожжей *S. cerevisiae*; установлении активной субстанции препарата суммарной РНК дрожжей, определяющей его радиопротекторные свойства; изучении механизма радиопротекторного действия препарата дцРНК; сравнении эффективности радиозащитного действия штатного радиопротектора Б-190 и препарата дцРНК. По итогам проведенных исследований автором сформулировано 3 положения, выносимых на защиту, обоснованность и достоверность которых подтверждается существенным объемом полученных и проанализированных экспериментальных данных.

Глава «**Обзор литературы**» содержит исчерпывающий анализ источников литературы, касающихся механизмов и принципов действия радиопротекторов, репарации ДНК. Акцент сделан на анализе возможности интернализации нуклеиновых кислот в

эукариотические клетки и их участия в различных репаративных процессах. Следует отметить, что обзор литературы хорошо структурирован, логичен и последователен.

Глава «**Материалы и методы**» содержит информацию о материале и использованных цитогенетических, молекулярно-генетических, биохимических и статистических методах. Подробно описаны все использованные методы, клеточные культуры и лабораторные животные. Однако сильно не хватает подробного описания всех схем экспериментов и использованных в них групп лабораторных животных. Частично эти схемы приведены на рисунках в главе «**Результаты**», однако в некоторых случаях описание неполное и не всегда дает возможность полностью представить схемы экспериментов. Работа проведена с использованием большого комплекса современных методов анализа. Статистические методы адекватны и не вызывают сомнений в значимости полученных результатов. Несомненной ценностью дизайна работы является проведение исследований на мышах *in vivo*.

Глава «**Результаты**» представляет собой центральный раздел диссертационного исследования. В работе получены результаты, обладающие высокой степенью научной новизны, фундаментальной и практической значимостью. В работе охарактеризовано радиопротекторное действие суммарной РНК пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Показано, что ключевым компонентом с радиопротекторным действием является двуцепочечная РНК со свободными концами. Обнаружено, что дцРНК относительно стабильна в плазме крови и может интернализироваться стволовыми клетками в костном мозге. Выжившие стволовые клетки образуют колонии в костном мозге и селезенке и эффективно восстанавливают гемопоэз у животных после летальной дозы ионизирующего излучения. Положения, выносимые на защиту, хорошо обоснованы и подтверждаются подробно обсужденными результатами.

К работе имеются некоторые вопросы и замечания.

Замечания:

1. В главе «**Материалы и методы**» указано, что введение препарата РНК проводилось за 30-60 мин до облучения, тогда как в главе «**Результаты**» для различных экспериментов время введения препарата РНК составляло от 12 суток до облучения до 4 ч после облучения.
2. Результаты секвенирования некоторых клонов, полученных из РНК *Saccharomyces cerevisiae*, в п. 3.4 главы «**Результаты**», показали присутствие в смеси различных последовательностей РНК, преимущественно рРНК. Из этих результатов делается заключение, являющееся частью вывода 2, о том, что «для радиозащитного действия

нуклеотидная последовательность фрагментов РНК не имеет значения». Однако из приведенных результатов нельзя сделать такой вывод, т.к. для этого необходимо сравнивать радиозащитные свойства образцов дцРНК с различными последовательностями, а этого не делалось. Фракция дцРНК из РНК дрожжей и должна содержать преимущественно рРНК. При этом вполне возможно, что радиозащитное действие осуществляется только частью молекул РНК в составе фракции 0,25 М, имеющих какие-то специфические характеристики, в том числе определяемые и их последовательностью.

3. В вывод 3 вынесено утверждение о том, что «ГСК, способны интернализировать дцРНК природным эндоцитозом, идущим по клатрин/кавеолин-зависимому типу с использованием энергии АТФ». Однако ингибитор клатрин-зависимого эндоцитоза хлорпромазин не показал значимого ингибирования интернализации дцРНК. Наоборот, эффект был противоположным. В связи с этим, выглядит необоснованным заключение об использовании этого пути для интернализации дцРНК. При этом заключения по результатам значимого ингибирования интернализации с помощью нистатина, ингибирующего эндоцитоз, опосредованный липидными рафтами, не представлено.
4. В вывод 1 в качестве показателя выживаемости при введении РНК за 30-60 мин до облучения взят только результат из первого эксперимента, описанного в работе, тогда как в других экспериментах для аналогичных условий воздействия были получены более низкие показатели - вплоть до 40% (рис. 15). Поэтому правильнее было бы указать в выводе 40-100% выживаемость при введении за 30-60 мин до облучения.

Вопросы:

1. В главе «Материалы и методы» указано, что для экспериментов использовалась РНК *Saccharomyces cerevisiae* производства НПО «Биолар» (Латвия), тогда как в главе «Результаты» в качестве производителя РНК указан БАВ ГНЦ ВБ «Вектор» (Россия). Чьего производства была РНК?
2. На рис. 23 приведена динамика содержания форменных элементов крови после облучения в контрольной группе мышей и группах, получивших препараты РНК на сроках до 35 суток после облучения (n=3). Учитывая, что большая часть мышей в контрольной группе погибала на 14-15 сутки, на рисунках приведены результаты, полученные только для выживших мышей или для всех мышей? Судя по тому, что в контрольной группе выжило только 2 мыши, а эксперимент по определению

форменных элементов крови был проведен на 3 мышах, группа была смешанная. Каким образом в таком случае анализировались результаты?

3. В разделе 3.9.2.6. "Оценка мутагенной активности дцРНК" в таблице 6 приведены только частоты хромосомных фрагментов. При этом не указано стандартное отклонение для средних значений. Проводился ли анализ частот других типов aberrаций и если да, то были ли они повышены в присутствии препаратов дцРНК? Использовались ли для анализа мутагенной активности дцРНК все клетки костного мозга, или только субпопуляция, интернализировавшая фрагменты дцРНК?
4. При описании различных патологических изменений в форменных элементах крови после облучения используются преимущественно качественные и оценочные формулировки ("многочисленные", "много"). Проводился ли количественный анализ частоты микроядер и других патологических изменений?

Вопросы и замечания оппонента не снижают высокую научную и научно-практическую ценность работы и не подвергают сомнению обоснованность положений.

Подводя итог анализу диссертационного исследования, необходимо подчеркнуть его несомненную новизну и научно-практическую значимость. В работе установлено, что дцРНК может обладать радиопротекторным действием и определены клеточные мишени такого воздействия в организме мыши. Показано, что дцРНК может интернализироваться стволовыми клетками костного мозга, что определяет их выживание после воздействия ионизирующего излучения в летальной дозе.

Полученные данные дополняют имеющиеся представления о роли экзогенных нуклеиновых кислот в ответе клеток на ионизирующее излучение и способствуют более глубокому пониманию возможностей модификации функционирования и стабилизации организма после генотоксического воздействия.

Заключение. В связи с вышеизложенным можно заключить, что диссертация Риттера Генриха Сергеевича "Изучение клеточных и молекулярных механизмов радиопротекторного действия двуцепочечной РНК *Saccharomyces cerevisiae*" является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований и разработок осуществлено решение научной проблемы – анализа радиопротекторного действия двуцепочечной РНК в стволовых клетках при воздействии ионизирующего излучения, что имеет существенное значение для развития клеточной биологии.

Работа соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» степеней (постановление Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842), а ее автор Риттер Генрих Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Официальный оппонент

Руководитель лаборатории инструментальной геномики
Научно-исследовательского института медицинской генетики
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук»
д-р биол. наук (1.5.7. Генетика)
Васильев Станислав Анатольевич



Подпись д-ра биол. наук С.А. Васильева удостоверяю
Ученый секретарь Федерального
государственного бюджетного научного учреждения
«Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук»
кандидат биологических наук
Хитринская Ирина Юрьевна

