

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Кузьминой Нины Станиславовны на тему «Изучение отдаленных генетических и эпигенетических нарушений у облученных лиц и их потомков», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Несмотря на имевшие место на рубеже веков крупные радиационные аварии и развязанную затем радиофобийную пропаганду использование различных источников ионизирующих излучений в энергетике, науке, медицине и ряде областей промышленности продолжается. Как и в любой техногенной области, это может сопровождаться возникновением ситуаций с поражением персонала и населения. В настоящее время в радиобиологических исследованиях наибольшее внимание уделяется действию облучения в диапазонах малых (свыше 10 до 100 мГр) и средних (свыше 100 до 1000 мЗв) доз. В частности, одной из мишеней для такого воздействия служит генетический аппарат человека, как на уровне отдельных клеток, так и целостного организма. Повреждение наследственных структур вызывает и клеточную гибель, и злокачественную трансформацию. При этом конкретная значимость различных генотоксических эффектов оказывается недостаточно изученной, особенно, в отношении потомков облучённых людей. Если на дрозофилах и мышах реально показаны наследственные нарушения, связанные с радиационным воздействием, то для человеческих популяций и на уровне низкодозовых воздействий вопросы их индукции всё ещё остаются на уровне гипотез. Настоящая работа как раз и посвящена изучению отдалённых генетических эффектов радиационного воздействия, включая трансгенерационные процессы и поиск маркеров перенесенного облучения, на материале лиц, подвергшихся радиационному воздействию, и их потомков. Поэтому тема диссертации является крайне **актуальной** и заслуживающей научного анализа и обобщения.

**Новизна исследований и полученных результатов** обусловлена широким спектром выбранных генетических и молекулярно-генетических методик, использованных для обследования разнородных категорий облучённых людей и их потомков. К этим когортам относятся ликвидаторы последствий аварии на Чернобыльской АЭС и их дети; два поколения жителей территорий, загрязнённых

радионуклидами в результате этой катастрофы; дети специфической группы профессионалов-атомщиков из Российского федерального ядерного центра (г. Саров), которые 40-50 лет назад работали с тритием и его окисью, причём в этом случае изучался полиморфизм мини- и микросателлитных локусов. Также было осуществлено исследование уровня гиперметилирования CpG-островков промоторов ряда генов, связанных с защитными функциями клеток. На применении современных методических подходов, репрезентативности выборок разных контингентов обследованных лиц, использовании адекватной статистической обработки данных основана **достоверность** полученных результатов. Материалы диссертации хорошо **апробированы**. Они были представлены почти на 30 различных отечественных и международных научных конференциях, съездах и т.п. По теме диссертации опубликовано 23 статьи в рецензируемых изданиях, 11 глав и статей в книгах и сборниках трудов, 35 тезисов докладов.

Представленный в работе комплексный подход к оценке состояния генома и эпигенома в клетках людей спустя длительные сроки после их облучения в малых и средних дозах и у их потомков, выявление системного характера поражения наследственного материала и сопряжённости между различными показателями обуславливает **научную и практическую значимость** выполненной работы. Она расширяет знания о радиобиологических непосредственных и трансгенерационных эффектах и рисках воздействия пролонгированного/хронического внешнего и внутреннего излучений. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости расширения спектра исследуемых генов и эпигенетических маркеров перенесенного в прошлом радиационного поражения и прогноза ухудшения состояния облучённых индивидуумов и их потомков.

Переходя к непосредственной оценке содержания диссертации, отмечу, что она состоит из «Введения», главы «Обзор литературы» с подразделами, главы «Материалы и методы» с подразделами, главы «Результаты исследований» с подразделами, главы «Заключение», включающей «Краткие итоги результатов исследований» и «Обсуждение», и главы «Выводы», «Списка литературы», «Списка работ, опубликованных по теме диссертации» и главы «Приложение». В

«Списке литературы» содержится библиографическое описание пронумерованных в алфавитном порядке 589 работ, из которых в отечественных изданиях напечатано 169 статей, за рубежом – 420. В целом диссертация содержит 385 страниц компьютерного текста и включает 35 таблиц и 41 рисунок.

Во «Введении», как это и положено, раскрыты актуальность темы и степень её разработанности; цель и задачи исследования; методология и методы исследования; степень достоверности и апробация результатов; личный вклад автора; основные положения, выносимые на защиту; научная новизна полученных результатов; теоретическая и практическая значимость работы.

«Обзор литературы» очень подробный и в соответствии с поставленными задачами включает несколько направлений исследования генетического материала. Прежде всего, описываются обширные данные научной литературы по цитогенетическому обследованию людей, входивших в различные контингенты лиц, пострадавших в результате аварии на Чернобыльской АЭС. К этим когортам относятся сами ликвидаторы последствий этой катастрофы и их дети; взрослые индивидуумы и их дети, проживающие или проживавшие на радиоактивно-загрязнённых территориях. Кроме этого, в обзор включены и результаты цитогенетических исследований жителей других загрязнённых зон, к которым относятся местности около Семипалатинского полигона и реки Течи на Южном Урале. Представленные данные рассмотрены с позиций учёта дозовых связей обнаруженных цитогенетических эффектов, динамики их величины с течением времени и наличия клинической патологии. Отмечается имеющаяся противоречивость между данными различных авторов по поводу цитогенетических эффектов в культурах лимфоцитов периферической крови детей, проживающих на загрязнённых территориях

Далее в «Обзоре литературы» имеется раздел, посвящённый иммуногенетическим эффектам, т.е. исследованию генетических мутаций с помощью использования моноклональных антител, меченных теми или иными флуорохромами, к рецепторам, экспрессированным на клеточной мембране. В начале автор даёт характеристику анализа «генных мутаций и готовности клеток к апоптозу» как подходу к «оценке радиационно-индуцированных эффектов в



организме человека». Здесь в общем говорится о мутациях по локусам гликофорина А (GPA), Т-клеточного рецептора и рецептора CD95, связанного с апоптозом. Далее следуют подразделы, посвящённые непосредственно мутациям по этим локусам у облучённых лиц. В этом месте я вынужден заметить, что диссертант, с моей точки зрения, уделил неоправданно большое внимание мутациям по гликофориновому локусу в эритроцитах, т.к. в самой работе они не исследовались, да и их применение в радиационной генетике ограничено только лицами, гетерозиготными по данному локусу.

Следующий раздел посвящён мутациям, индуцированным радиацией в мини- и микросателлитных локусах у людей и мышей в сравнительном аспекте. Интерес к этому виду генетических повреждений обусловлен тем, что по настоящее время эпидемиологические исследования не дали явных доказательств влияния облучения на наследственность человека, а указанные tandemные повторы относятся к некодирующим последовательностям и, таким образом, изменения в них ускользают от элиминации при развитии зародыша. В диссертации в данном разделе даётся их общая характеристика, оценивается возможность их использования как маркеров воздействия радиации, приводятся данные литературы по их выявлению у потомков лиц, облучённых при ядерных бомбардировках японских городов, ликвидации аварии на Чернобыльской АЭС, в ходе профессиональной деятельности, проживания на загрязнённых радионуклидами территориях, в результате проведения лучевой терапии.

В заключительном разделе «Обзора литературы» подробно описаны индуцированные воздействием ионизирующих излучений изменения метилирования ДНК как эпигенетической трансформации геномов человека и мыши в повторяющихся и локус-специфических элементах ДНК. Рассмотрены как результаты экспериментов, так и обследования людей, облучённых при их профессиональной деятельности; представлены современные точки зрения о механизмах и последствиях радиационно-индуцированных нарушений метилирования. Также имеется подраздел, посвящённый возрастным изменениям метилирования ДНК, в связи с постулируемыми в радиобиологии процессами радиационно-индуцированного старения.

Таким образом, в целом необходимо оценить «Обзор литературы» как достаточный, критический и выполненный на хорошем научном уровне.

Диссертация написана на основе результатов цитогенетического и молекулярно-генетического обследования различных экспонированных, необлучённых и контрольных групп людей. Поэтому в главе «Материалы и методы» приведена характеристика этих контингентов, включая доступные дозовые оценки и клинические данные. Цитогенетическому обследованию были подвергнуты дети-жители территорий, радиоактивно загрязнённых после аварии на Чернобыльской АЭС, разделённые на три группы: «постнатально облученные в возрасте от 3 мес. до 4 лет в 1986 году (родившиеся до аварии), внутриутробно облученные во время аварии в 1986 году, родившиеся после аварии в 1987 - 2007 гг. от облученных родителей». Подсчёт aberrаций хромосом был проведен и у родителей детей, родившихся после данной катастрофы, т.е. сами родители также были облучены, причём в разных стадиях онтогенеза. Имелся контроль, состоявший из представителей населения (взрослых и детей), проживавшего на чистых территориях. Другая группа состояла из отцов-ликвидаторов, их необлучённых детей и (частично) жён. Кроме цитогенетического анализа, у части отцов-ликвидаторов и их детей было проведено изучение генных мутаций по локусам Т-клеточного рецептора и CD95. Исследование уровня полиморфизма в различных мини- и микросателлитных локусах было осуществлено у детей профессионалов-атомщиков (работа с тритием и его окисью, г. Саров) и из местной контрольной группы индивидуумов. При изучении гиперметилирования CpG-островков промоторов ряда генов защитных клеточных систем были выделены две выборки независимо облучённых лиц. Одна была гетерогенной и включала ликвидаторов Чернобыльской аварии, атомщиков из г. Сарова и взрослых жителей загрязнённых территорий. Частично были обследованы и их дети. Имелись соответствующие контрольные группы. Вторая выборка состояла из работников реакторного и радиохимического цехов ПО «Маяк», подвергшихся, соответственно, пролонгированному внешнему гамма- и сочетанному внешнему гамма- и внутреннему альфа-облучению. Контрольная группа состояла из

необлучённых жителей г. Озёрска (город, в котором, собственно, и размещено ПО «Маяк»). Всё перечисленное изложено достаточно подробно.

Далее в главе «Материалы и методы» подробно излагаются собственно технологии выполнения использованных методик цитогенетического исследования; проточной цитофлуорометрии для анализа TCR-мутаций и клеток, экспрессирующих маркер апоптоза (иммунофенотип CD95+); выделения ДНК, ПЦР-амплификации и электрофореза для анализа мутаций в мини- и микросателлитных локусах ДНК; метилчувствительной ПЦР, амплификации и электрофореза для анализа гиперметилирования CpG-островков.

В окончании главы «Материалы и методы» обозначены методы статистической обработки результатов, включавшие описательную статистику, различные критерии оценки различий между группами, анализ многомерной изменчивости, корреляционный и регрессионный анализы.

Таким образом, надо констатировать, что выполненные методики в целом являлись вариантами в ряде случаев с собственной модификацией общепринятых подходов и в этом отношении являются достаточно надёжными.

В Главе 3 представлены результаты исследований. Начальный раздел посвящён цитогенетическому анализу культур лимфоцитов периферической крови лиц, проживающих на радиоактивно-загрязнённых территориях. К ним относятся дети, рождённые до аварии на Чернобыльской АЭС; дети, подвергшиеся внутриутробному облучению во время аварии; дети, родившиеся после аварии. В последнем варианте обследованы и их родители, подвергнутые радиационному воздействию до рождения потомков. Были обнаружены значимо повышенные по сравнению с контролем уровни ряда цитогенетических нарушений в обоих поколениях людей, постоянно проживающих на загрязнённых территориях. У детей, рождённых после аварии, те или иные цитогенетические показатели имели тенденцию быть ниже, чем у их родителей, по-видимому, вследствие более длительного пребывания последних в условиях радиационного воздействия, при этом отсутствовала связь между годом рождения и уровнем aberrаций хромосом.

В семьях ликвидаторов цитогенетические показатели у отцов и детей значимо превышали таковые в семьях контрольной популяции, тогда как у



необлучённых матерей обеих групп они были статистически одинаковыми. Была отмечена положительная корреляция средней силы между суммарной частотой разрывов хроматид у отцов ликвидаторов и их детей. При этом не были выявлены различия между детьми, зачатыми в разные промежутки времени после окончания работы их отцами в зоне аварии на Чернобыльской АЭС. Величины частот TCR-мутаций у отцов-ликвидаторов и их необлучённых детей существенно превышали контрольные показатели при отсутствии зависимости от года рождения. Аналогичная картина наблюдалась и для частот CD95<sup>+</sup>-лимфоцитов, как показателей апоптоза. При этом у отцов-ликвидаторов наблюдалась корреляция между рядом цитогенетических и иммуногенетических показателей, которая отсутствовала у их детей.

По мутациям в минисателлитных локусах атомщики г. Сарова и их дети существенно не отличались от контрольной популяции. Частота мутаций в микросателлитных локусах у профессионалов существенно превышала таковую в контрольной группе, тогда как у детей при исключении семьи, в которой отец был облучён в значительно большей дозе (1 Гр), чем остальные работники, увеличение числа мутаций оказалось статистически не значимым.

При изучении эпигенетических эффектов в двух указанных выше независимых выборках были получены следующие результаты. В выборке 1 («смешанной») доля лиц с выявленными случаями метилирования промоторов в одном и двух локусах была существенно выше, чем контроле. У детей же, рождённых от облучённых и необлучённых родителей, таких различий не наблюдалось. Также был обнаружен очень интересный факт, что гиперметилирование промоторов одних локусов связано только с возрастом, а других только с радиационным воздействием. Данные полученные на второй выборке («ПО Маяк») в целом, хотя бы в определённой мере и на уровне тенденции, подтвердили этот вывод как у работников реакторного цеха (внешнее гамма-облучение), так и у работников радиохимического производства (сочетанное внешнее гамма- и внутреннее альфа-облучение). Одновременно на материале обеих групп работников ПО «Маяк» были обнаружены дополнительные гены, гиперметилирование которых было обусловлено радиационным воздействием. При

этом в обеих группах наблюдалась значимая дозовая зависимость эпигенетических изменений на уровне средней корреляции. Весьма показательной была выявленная сопряжённость (хотя и слабой силы) между цитогенетическими и эпигенетическими показателями.

Далее следует глава «Заключение», разделённая на две части «Краткие итоги результатов исследований» и «Обсуждение», хотя, с моей точки зрения, было бы правильно не разделять эту главу на два раздела, т.к. естественным образом образуются некоторые повторения. При этом я высоко оцениваю осуществленный диссертантом анализ полученных собственных данных с привлечением обширной информации, полученной другими исследователями.

Выводы являются точным отражением полученных результатов и с этой точки зрения полностью обоснованны, а сами результаты, в целом, соответствуют поставленным цели и задачам исследования.

Содержание автореферата полностью согласуется с текстом диссертации и отражает её основные положения и выводы.

Отмеченные немногочисленные замечания никак не влияют на сложившееся у меня общее положительное мнение о рассмотренной работе.

Подводя итог выше сказанному, следует констатировать, что в целом по актуальности, новизне, научной и практической значимости, объему представленного материала, достоверности и обоснованности полученных результатов данное диссертационное исследование Кузьминой Нины Станиславовны является завершённой научно-квалификационной работой, в которой решена очень важная проблема выявления молекулярных маркёров воздействия радиации на наследственный аппарат облучённых лиц и трансгенерационной передачи генетических повреждений их потомкам. Таким образом, эта работа полностью отвечает критериям, изложенным в пп. 9–11 и 13–14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции постановления Правительства РФ № 335 от 21 апреля 2016 года «О внесении изменений в Положение о присуждении учёных степеней» и постановлений Правительства РФ № 1024 от 28 августа 2017 г. и № 1168 от 1 октября 2018 г.), и предъявляемых к



диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор Кузьмина Нина Станиславовна заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Официальный оппонент:

Зав. лабораторией  
радиационной гематологии и цитогенетики  
Центра биомедицинских и аддитивных технологий  
Федерального Государственного бюджетного учреждения  
«Государственный научный Центр Российской Федерации  
– Федеральный медицинский биофизический центр  
имени А.И. Бурназяна»  
Федерального медико-биологического агентства России  
123182, г. Москва, ул. Живописная, д. 46  
E-mail: [fmbs-fmba@bk.ru](mailto:fmbs-fmba@bk.ru)  
тел/факс 8(499) 190-96-00,  
доктор биологических наук

В.Ю. Нугис

Подпись В.Ю. Нугиса удостоверяю

Учёный секретарь ФГБУ ГНИ ФМБ  
им. А.И. Бурназяна ФМБА России,  
кандидат медицинских наук



Е.В. Голобородько

21 мая 2021 г.