

ОТЗЫВ

Официального оппонента

на диссертацию Арутюняна Тиграна Ашотовича

«Разработка биомаркеров геномной нестабильности в клетках человека»,
представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по
специальности 03.00.15 - «Генетика»

Диссертационная работа Т.А. Арутюняна посвящена актуальной проблеме современной генетики - разработке и валидации комплекса биомаркеров, позволяющих количественно оценивать геномную нестабильность при действии физических, химических и биологических факторов. Актуальность выбранного направления не вызывает сомнений, поскольку повреждения ядерной и митохондриальной ДНК, вариации числа копий ДНК, теломерная дисфункция и хромосомные нарушения участвуют в канцерогенезе, хроническом воспалении, инфекционных процессах и старении. В этих условиях создание согласованной системы маркеров, применимой в моделях *in vitro* и допускающей оценку клинической значимости *in vivo*, представляет как фундаментальный, так и прикладной интерес.

Цель исследования сформулирована четко и соответствует теме работы. Для ее достижения автором поставлен комплекс из тринадцати взаимосвязанных задач, охватывающих анализ интерстициальных и терминальных повреждений хромосом после облучения ультракороткими импульсами ускоренных электронов, изучение доксорубицин-индуцированных изменений митохондриальной ДНК, создание клеточных моделей геномной нестабильности путем подавления экспрессии гена линкерного гистона H1-5, а также оценку клинической информативности биомаркеров у пациентов с COVID-19. Такая логика исследования обеспечивает последовательный переход от экспериментальной модели к анализу патологического состояния человека.

Методическая база работы отличается широтой и адекватностью поставленным задачам. В исследовании использованы локус-специфическая и количественная флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), анализ CNV и длины теломер, синтез зондов к митохондриальной ДНК методом DOP-ПЦР, ПЦР и RT-qPCR, щелочной метод ДНК-комет, микроядерный тест, методы оценки жизнеспособности клеток и редактирование генома CRISPR-Cas9. Экспериментальная часть выполнена на лейкоцитах периферической крови, буккальных клетках и ряде нормальных и опухолевых клеточных линий человека. Клинико-биологический раздел включает 65 госпитализированных пациентов с подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2; проведение исследования сопровождалось этическим одобрением и получением информированного согласия. Для обработки результатов применен комплекс параметрических и непараметрических критериев, корреляционный, ROC/AUC- и многофакторный регрессионный анализ.

Научная новизна исследования является существенной. К наиболее значимым результатам следует отнести разработку комплексного молекулярно-цитогенетического подхода к одновременной характеристике интерстициальных повреждений по CNV и терминальных повреждений по длине теломер; выявление неодинаковой радиочувствительности отдельных хромосомных локусов; установление более выраженной дозозависимой чувствительности теломер лейкозных клеток по сравнению с нормальными лейкоцитами. Впервые, согласно представленным данным, обнаружены индуцированные доксорубицином *de novo* инсерции митохондриальной ДНК в хромосомы человека и предложен подход к анализу их распределения методом FISH. Важное место занимает характеристика клеточной и внеклеточной митохондриальной ДНК как источника потенциальных маркеров химически индуцированной генотоксичности.

Отдельного внимания заслуживают результаты, полученные при подавлении экспрессии гена H1-5 с использованием CRISPR-Cas9. Показано увеличение уровней повреждения ДНК и микроядер в нормальных и опухолевых клетках, а также усиление доксорубицин-индуцированной геномной нестабильности по сравнению с клетками дикого типа. Тем самым автор не ограничивается описанием маркеров, а связывает их изменения с одним из механизмов поддержания организации хроматина и устойчивости генома.

Клиническая часть работы логично дополняет эксперименты *in vitro*. Комплексная оценка процента ДНК в хвосте кометы, длины теломер лейкоцитов и булльских клеток и уровня 8-OHdG позволила охарактеризовать фенотип геномной нестабильности при COVID-19 и его связь с тяжестью заболевания, полом и возрастом пациентов. Представлены пороговые значения, показатели чувствительности и специфичности, а также результаты многофакторного анализа. Наиболее устойчивую связь с тяжестью заболевания, по данным автореферата, продемонстрировала длина теломер лейкоцитов. Полученные результаты создают основу для дальнейшей клинической валидации предложенной панели биомаркеров.

Практическая значимость работы определяется возможностью использования разработанных подходов при экспериментальной оценке генотоксического действия ионизирующего излучения и противоопухолевых препаратов, при создании клеточных тест-систем, а в перспективе - при клинической интерпретации повреждений генома. Предложенная концепция объединяет маркеры на нескольких уровнях организации генома и формирует методологическую основу для дальнейшей стандартизации исследований в радиобиологии, генетической токсикологии и молекулярной медицине.

Достоверность результатов обосновывается использованием взаимодополняющих молекулярно-генетических, цитогенетических и статистических методов, наличием контрольных вариантов и повторностей, сопоставлением данных, полученных на разных клеточных моделях, а также апробацией результатов на международных научных мероприятиях. По теме диссертации опубликованы 16 статей, 10 тезисов, 3 главы в книгах и одна

монография. Содержание диссертации и автореферата позволяет заключить, что опубликованные работы отражают основные направления и результаты исследования. Диссертация изложена на 233 страницах, содержит 81 рисунок и 37 таблиц; ее структура соответствует логике поставленных задач.

Заключение. Автореферат адекватно отражает содержание, основные положения и результаты диссертационной работы. Диссертация Т.А. Арутюняна «Разработка биомаркеров геномной нестабильности в клетках человека» является завершенным научно-квалификационным исследованием, в котором решена крупная научная задача, имеющая значение для генетики, радиобиологии, генетической токсикологии и молекулярной медицины. По актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований, достоверности и практической значимости полученных результатов работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор, Тигран Ашотович Арутюнян, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.15 - «Генетика».

Официальный оппонент,
Почетный работник высшего профессионального
образования Российской Федерации,
доктор биологических наук,
профессор кафедры генетики
Южного федерального университета

Т.П. Шкурят

Подпись профессора Татьяны Павловны Шкурят, заверяю:
Главный учёный секретарь Учёного совета ЮФУ



О.С. Мирошниченко

Контакты:

Почтовый адрес: 344090 Россия, Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1, Академия биологии и медицины ЮФУ, кафедра генетики, оф. 106.

Телефон: +79282961033;

эл. почта tshkurat@sfedu.ru

Наименование организации: ФГАОУ «Южный федеральный университет»

Занимаемая должность: профессор кафедры генетики.