

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА
Д 002.230.01 НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ПО ДИССЕРТАЦИИ **КУРАНОВОЙ МИРЬИ ЛЕОНИДОВНЫ**
НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 23 января 2015 № 192/370

О присуждении **КУРАНОВОЙ МИРЬЕ ЛЕОНИДОВНЕ** (Россия) учёной степени кандидата биологических наук

Диссертация **«КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ АТАКСИИ-ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ»**

по специальности 03.03.04 – клеточная биология, гистология, цитология

принята к защите 24.10.2014 г., протокол № 188/367 Диссертационным советом Д 002.230.01, созданный на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, адрес: Тихорецкий проспект, д.4, Санкт-Петербург 194064, Россия, утверждён приказом Минобрнауки РФ № 105/нк от 11.04.2012 г.

Соискатель Куранова Мирья Леонидовна, 1985 года рождения, в 2010 г. окончила факультет медицинской физики и биоинженерии по направлению прикладные математика и физика (специализация «прикладные математика и физика»), с присвоением степени магистра. С 1.10.2010 - по 1.10. 2014 гг – очная аспирантура в Санкт-Петербургского государственного

политехнического университета института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций кафедры биофизика. Диссертация выполнена в порядке прохождения аспирантуры.

Работает в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии РАН с 2008 года в Лаборатории радиационной цитологии, с 2010 года по настоящее время – младший научный сотрудник.

Диссертация выполнена в Лаборатории радиационной цитологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии РАН.

Научный руководитель – кандидат биологических наук, доцент **СПИВАК ИРИНА МИХАЙЛОВНА**, старший научный сотрудник Лаборатории радиационной цитологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии РАН.

Официальный оппоненты:

1. **ПОПОВИЧ ИРИНА ГРИГОРЬЕВНА**, доктор биологических наук, заведующей Лаборатории фармакологии пептидов отдела геронтологии Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН.
 2. **ВОРОБЦОВА ИРИНА ЕВГЕНЬЕВНА**, доктор биологических наук, профессор, руководитель Лаборатории радиационной и онкологической генетики российского научного центра радиологии и хирургических технологий (Санкт-Петербург) Минздрава РФ.
- дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава РФ,

Санкт-Петербург в своём положительном заключении, (заключение составлено руководителем отдела канцерогенеза и онкогеронтологии ФГБУ «Научно-исследовательского института онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава РФ (Санкт-Петербург), членом-корреспондентом РАН, доктором медицинских наук, профессором В.Н. Анисимовым и старшим научным сотрудником лаборатории канцерогенеза и старения, кандидатом медицинских наук П.А. Егорминым и утверждено директором ФГБУ «Научно-исследовательского института онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава РФ (Санкт-Петербург), доктором медицинских наук, профессором, А.М. Беляевым) указала, что диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне, результаты представляют научно-практическую ценность и соискатель заслуживает присуждения искомой степени, и

- дала положительный отзыв на диссертацию.

Соискатель имеет 26 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 18 публикаций, из них 3 работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях, в том числе 2 статьи входят в рекомендованный перечень ВАК.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. Куранова, М.Л. Диагностика атаксии-телеангиэктазии с помощью экспресс-теста, основанного на методе непрямой иммунофлуоресценции / Куранова М.Л., Ледащева Т.А., Тулуш Е.К., Беляев Д.Л., Жеребцов С.В., Плескач Н.М., Прокофьева В.В., Михельсон В.М., Спивак И.М. // Цитология. – 2013. – Т. 8. - №55. – С. 560 – 565. В статье показаны результаты разработки клеточного метода диагностики атаксии-телеангиэктазии, основанного на выявлении активной формы киназы АТМ – фосфо-АТМ.

2. Куранова, М.Л. Протеинкиназа фофо-АТМ и длина теломер при атаксии-телеангиэктазии / Куранова М.Л., Ледащева Т.А., Тулуш Е.К., Рунов А.Л., Молодан Л.А., Гречанина Е.Я., Плескач Н.М., Спивак И.М., Михельсон В.М. // Сборник материалов I международного форума "Молекулярная медицина – новая модель здравоохранения XXI века: технологии, экономика, образование". – 2013. – С. 255 – 265. В статье показаны особенности нарушения функциональной активности киназы АТМ и изменения длин теломер при атаксии-телеангиэктазии. Продemonстрировано, что длины теломер во всех линиях пациентов АТ достоверно ниже по сравнению с длинами здорового донора.
3. Куранова, М.Л. Мозаичные формы атаксии-телеангиэктазии / Куранова М.Л., Плескач Н.М., Ледащева Т.А., Михельсон В.М., Спивак И.М. // Цитология. – 2014. – Т. 8. – № 56. – С. 619 – 629. В статье описаны мозаичные формы заболевания атаксия-телеангиэктазия (АТ) и характерные изменения уровня SIRT6 и H3K27me3 при АТ. Продemonстрировано, что уровень гистоновой деацетилазы в ядрах всех клеток дермальных фибробластах достоверно выше, чем в ядрах клеток здорового донора и других наследственных заболеваний.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Доктора биологических наук профессора кафедры цитологии, гистологии СПбГУ **Е.Р. Гагинской**. Отзыв положительный, без замечаний.
2. Декана биолого-почвенного факультета СПбГУ, заведующей кафедры цитологии, гистологии доктора биологических наук, профессора **А.Д. Харазовой**. Отзыв положительный, имеются критические замечания.

Интересными представляются результаты, полученные на клетках линии с наиболее тяжёлой формой АТ, в которой детектировалось достаточно большое количество фокусов сайтов фосфорилирования

киназ АТМ и АТР в интактном состоянии. Тем не менее, к данной главе есть некоторые замечания. Во-первых, хотелось бы получить от автора больших причин данного явления. Во-вторых, название этой главы можно было бы подобрать более корректно. Выше изложенные замечания носят рекомендательный характер и не снижают значимости работы. По своей актуальности и научно-практической значимости работа достойна искомой степени

3. Заведующего лаборатории дозиметрии обеспечения радиационной безопасности отдела ядерной медицины всероссийского центра экстренной и радиационной медицины им. Никифорова МЧС России к.б.н. **Д.В. Фирсанова**. Отзыв положительный, содержит замечания.

Автореферат в целом содержит хорошее впечатление. Хотя некоторые подписи к рисункам можно было бы сформулировать более корректно. И не хватает в некоторых главах более подробных объяснений полученных результатов. В целом автореферат построен достаточно логично и хорошо проиллюстрирован графиками и рисунками. Ещё некоторые вопросы по автореферату:

- I. Желательно было бы обосновать выбор дозы обучения 2 Гр.

Второе.

- II. Клеточные линии АТ представляют собой фундаментальную ценность для анализа клеток на повреждения ДНК на молекулярном и клеточном уровнях. Однако, с точки зрения заболевания наиболее логичным представляется использование лимфоцитов, выделенных из периферической крови пациентов, процедура получения которых представляется более лёгкой задачей по сравнению с получением культуры фибробластов. Интересно мнение автора по этому вопросу. Высказанные замечания не умаляют достоинства работы, которая представляет значительный

интерес и практическую ценность. Работа достойна искомой степени.

4. Отзыв младшего научного сотрудника Лаборатории молекулярных основ дифференцировки клеток Института цитологии РАН к.б.н. **И.И. Суворовой**. Отзыв положительный, имеет критические замечания.

При прочтении автореферата возникли некоторые замечания, связанные с оформлением и демонстрацией результатов. Так, на рис.1 и рис.2 представлены результаты только облучённых клеток. Без презентации контрольных, необлучённых клеток. Дополнительно, хорошо было бы сделать подписи к этим рисункам более подробней. А именно – указать ДНК-повреждающие агенты, дозу, подписать цвета, соответствующие тем или иным клеточным структурам и белкам. Кроме того, хотелось бы попросить автора разъяснить чуть подробнее, с чем связано более высокий уровень активации компонентов АТМ-АТР сигнального пути в клетках пациента с тяжёлой формой АТ по сравнению с клетками, полученными от здорового донора. Однако данные замечания носят исключительно рекомендательный характер и не снижают положительной оценки автореферата.

5. Научного сотрудника Лаборатории №61 научно-исследовательского института гигиены, проф.паталогии и экологии человека к.б.н. **И.С. Колесниковой**. Отзыв положительный, без замечаний.
6. Заведующего кафедры биохимии УО «Гомельский государственный медицинский университет» доктора медицинских наук, профессора **А.И. Грицука**. Отзыв положительный, без критических замечаний.

В дискуссии принимали участие:

1. Доктор биологических наук, профессор, **С.Н. Борхсениус**, член Совета

2. Доктор биологических наук, **С.Ю. Хайтлина**, член Совета
3. Доктор биологических наук, **Д.С. Боголюбов**, член Совета
4. Профессор, доктор биологических наук член совета, **М.И. Мосевицкий**
5. Кандидат биологических наук, **В.О. Чагин**
6. Профессор, доктор медицинских наук, член Совета, **М.Ю. Шавловский**
7. Профессор, доктор биологических наук, член Совета, **Е.С. Корнилова**
8. Кандидат биологических наук, **О.В. Анацкая**

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высокой квалификацией выбранных специалистов в области клеточной биологии и изучения механизмов старения для более объективной оценки полученных результатов, представленных в диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработан метод клеточной диагностики редкого наследственного аутосомно-рецессивного мультисистемного заболевания с нейродегенеративным проявлением (преждевременное старение) — атаксии-телеангиэктазии (АТ) (ОМIM заболевание: 208900). Заболевание возникает в результате мутаций в гене *ATM*, кодирующем ключевую киназу ATM, участвующую в ответе на повреждения ДНК. Метод основан на выявлении активной формы ATM — p-ATM с использованием не прямой иммунофлуоресценции. С использованием данного метода также впервые описаны мозаичные формы АТ, при которых часть клеток содержала активную форму p-ATM, а часть — нет. Описаны некоторые клеточные и молекулярные особенности проявления АТ. На подобранной группе

клеточных культур исследованы состояние ядерной ламины, содержание SA- β -Gal, длина теломер, средняя интенсивность флуоресценции HP1- γ , триметилированные формы гистона H3 H3K9me3 и H3K27me3 и гистоновые деацетилазы SIRT1 и SIRT6.

Предложен оригинальный подход к анализу данных интенсивности флуоресценции посредством разбиения полученных данных на диапазоны интенсивности, позволивший выявить два пика интенсивности флуоресценции деацетилазы SIRT6 в мозаичных линиях АТ.

Доказаны различия в содержании SA- β -Gal, в длинах теломер, количестве аббераций ядерной ламины, уровне средней интенсивности флуоресценции HP1- γ , H3K27me3 и SIRT6 при АТ и других редких наследственных заболеваниях.

Введены новые представления о роли киназы АТМ в регуляции хроматина через гистон H3K27me3 и деацетилазу SIRT6.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано существование мозаичных форм атаксии-телеангиэктазии. Доказаны различия в интенсивности флуоресценции HP1- γ , H3K27me3 и SIRT6 при АТ и других редких наследственных заболеваниях, а также различия в интенсивности флуоресценции данных белков в зависимости от формы заболевания.

Применительно к проблеме диссертации результативно использован комплекс современных методов клеточно-молекулярного анализа, включающий получение и ведение первичных культур, метод непрямой иммунофлуоресценции, выделение ДНК, ПЦР в реальном времени, а также методы статистической обработки данных.

Изложены новые экспериментальные факты, показывающие, что нарушение функционирования киназы ATM и его последствия могут проявляться в различной степени – как полностью во всех клетках линии, так и частично, что коррелирует с уровнем интенсивности флуоресценции HP1-γ, H3K27me3 и SIRT6.

Проведена оценка вклада дисфункции киназы ATM в процессы регуляции хроматина, укорочения теломер, изменения уровня SA-β-Gal и накопления aberrаций ядерной ламины.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработан и введен в медицинскую практику метод уточнения клинического диагноза АТ и синдрома Секкея 1 типа на клеточном уровне

Разработан и внедрен в практику научного исследования метод анализа данных об интенсивности флуоресценции путём разбиения на условно выбранные диапазоны.

Определены перспективы возможного практического применения результатов исследования при диагностике АТ и установления степени тяжести последствий нарушения функции киназы ATM на клеточном и молекулярном уровнях.

Представлены новые данные о клеточных и молекулярных особенностях при различных формах АТ.

Оценка достоверности результатов выявила:

экспериментальные данные, представленные в диссертации, получены на сертифицированном оборудовании, выбор использованных методов обоснован спецификой работы и поставленными в работе задачами, показана

воспроизводимость результатов, использованы современные экспериментальные подходы с применением адекватных методов и статистической обработки результатов;

теория характерных изменений на клеточном и молекулярном уровне при АТ построена на известных, проверенных данных и фактах, описанных в мировой научной литературе, и согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;

идея базируется на обобщении и анализе литературных данных и собственном экспериментальном материале;

использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой в диссертации тематике;

установлено, что авторские результаты согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение было обоснованным;

использованы современные экспериментальные подходы (получение и ведение первичных культур, выделение ДНК, ПЦР в реальном времени) и адекватные методы статистической обработки результатов.

Личный вклад автора состоит в:

Непосредственном участии соискателя в планировании и осуществлении всех экспериментов, получении, обработке, анализе и интерпретации экспериментальных данных, апробации результатов на научных конференциях, подготовке и написании публикаций по теме диссертации под непосредственным руководством научного руководителя и при взаимодействии с соавторами.

Диссертация является оригинальным, законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием, полностью отвечающим

требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

На заседании 23.01.2015 г. Диссертационный совет решил присудить **КУРАНОВОЙ МИРЬЕ ЛЕОНИДОВНЕ** учёную степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве **17 человек**, из них **докторов по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология -8**, участвовавших в заседании из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали:

«ЗА» - 16, «ПРОТИВ» -1, недействительных бюллетеней – НЕТ.

Председатель

Диссертационного совета Д002.230.01

Доктор биологических наук, профессор

Юдин А.Л.

Учёный секретарь

Диссертационного совета Д002.230.01

Кандидат биологических наук

Каминская Е.В.

«23» января 2015