

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Медведевой Юлии Сергеевны на тему «Полисистемная оценка генетически обусловленной радиочувствительности организма (экспериментальное исследование)», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология

Немногим более ста лет назад человечество узнало о существовании ионизирующей радиации и о том, что есть фактор среды, который мы не ощущаем, но который может губительным образом повлиять на состояние организма. Лишь в последние полвека стали известны основные причины повреждений при действии ионизирующего излучения, однако многие аспекты этого явления пока остаются неизученными. Поиску некоторых ответов на эти загадки посвящена работа Ю.С.Медведевой. Сейчас уже хорошо известно, что самой чувствительной к действию радиации в организме человека является система кроветворения, ее стволовые клетки, однако, хотя и в меньшей степени, но все же очевидно страдают и другие органы. Как показано во многих исследованиях, несмотря на то, что первичным результатом облучения является образование молекулярных обломков и свободнорадикальных продуктов, повреждающее действие радиации проявляется на всех уровнях организации живого. В связи с этим полисистемная оценка действия радиоактивного излучения является вполне своевременной.

На первых этапах развития радиобиологии считалось, что степень повреждения при облучении зависит лишь от поглощенной дозы, однако в дальнейшем было показано, что существует индивидуальная чувствительность к действию этого повреждающего фактора, что навело на мысль о существовании генетической предрасположенности или резистентности к радиационным повреждениям. И именно генетическая сторона проблемы затронута в рецензируемой работе.

Диссертация Ю.С.Медведевой является фундаментальным исследованием, однако полученные ею результаты весьма важны для практики и, прежде всего, диагностики, профилактики, лечения и реабилитации людей, встречающихся с ионизирующей радиацией. Это происходит в профессиональной сфере при работе с искусственными и естественными источниками радиоактивности, при выполнении космических полетов, а также в случаях аварий на радиоактивно-опасных объектах. Всё сказанное выше не оставляет сомнений в том, что представленная сегодня к защите работа является не только

весьма актуальной, но и оригинальной, поскольку сочетает в себе многогранность анализа биологических эффектов различных источников радиации и новизну полученных данных.

Переходя к оценке текста диссертации, необходимо сказать, что она построена по типичной схеме и содержит введение, обзор литературы, описание используемых материалов и методов, представление полученных результатов и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Имеется список сокращений. Всего диссертация изложена на 133 страницах и содержит 14 таблиц и 31 рисунок.

Как это принято в последнее время, введение к диссертации повторяет раздел «Общая характеристика работы», представленный в автореферате. Это не вызывает особых возражений, хотя по сути реальным введением к теме работы служит лишь страничка с обоснованием актуальности темы исследования.

Обзор литературы состоит из трёх частей. В первой части представлен общий взгляд на причины радиочувствительности организма, рассмотрено явление адаптации к действию ионизирующей радиации. Последняя проблема описана вполне корректно, хотя она представляет собой сложный и малоизученный раздел радиобиологии. Здесь также рассмотрена роль генетического аппарата клетки как одной из основных мишеней действия радиации, а также биохимических механизмов, способствующих защите организма от последствий облучения. При анализе проблемы полисистемности в оценке радиочувствительности организма автор диссертации справедливо отмечает, что в основе действия фактора ионизирующего излучения являются молекулярные и субмолекулярные события, которые уже впоследствии отражаются на более высоких уровнях организации вплоть до организменного. Можно согласиться с автором в том, что ограничивать оценку радиочувствительности лишь на клеточных моделях нецелесообразно ввиду участия в этом явлении многих систем организма на разных уровнях. При рассмотрении патофизиологических проблем влияния факторов космического полета Ю.С.Медведева обсуждает работы таких классиков как О.Г.Газенко, А.И.Григорьев, Г.Н.Крыжановский, Г.Селье, Ф.З.Меерсон, а также работы последних лет других авторов. Это демонстрирует глубокую теоретическую проработку патофизиологических сторон рассматриваемых проблем при подготовке диссертации. Обзор завершается анализом экспериментальных моделей, имитирующих действие отдельных факторов космического полета, некоторые из которых использованы автором в экспериментах. К данному обзору напрашивается еще один раздел, описывающий основы относительно нового метода лазерной корреляционной спектроскопии и его возможности в диагностике заболеваний и состояния организма, поскольку большая часть исследований в данной диссертации

выполнена именно этим методом. В последние годы обычным замечанием к литературному обзору является слабое цитирование отечественных работ. Диссертация Ю.С.Медведевой лишена этого недостатка, поскольку большинство источников в списке литературы принадлежит российским ученым, что объективно отражает их вклад в эту научную проблему. Следует также отметить, что большая часть работ в списке относится к последним пяти годам.

Диссертационное исследование Ю.С.Медведевой выполнено с привлечением большого количества методов, поэтому и раздел, посвященный материалам и методам, получился обширным – 16 страниц. Здесь перечислены этапы экспериментов, разбиение мышей трёх линий на экспериментальные группы, методы оценки действия ионизирующей радиации на различных уровнях организма: лазерная корреляционная спектроскопия для определения спектра размеров эндогенных нано- и микрочастиц крови, определение лейкоцитарной формулы, проточная цитометрия, оценка уровня апоптоза, гистологические методы, поведенческие модели, создание условий искусственной невесомости, статистические методы. В целом такая богатая методическая часть диссертации может свидетельствовать о полисистемности проведенных исследований и соответствует патофизиологической направленности работы.

Представлены результаты по трем этапам экспериментов: подготовительному, наземному и космическому.

Поскольку одним из аспектов цели работы являлась оценка генетически обусловленной радиорезистентности, автор на подготовительном этапе исследований (глава 3) оценила уровень экспрессии генов, имеющих отношение к синтезу белков, задействованных в системе радиационной защиты организма. Эта работа выполнена с использованием доступных в Интернете баз данных, из которых произведен отбор соответствующих генов различных линий мышей. Сведения об экспрессии этих генов были необходимы для последующего анализа роли генетического аппарата в получаемых данных о радиорезистентности.

Далее приводятся данные о влиянии однократного γ -облучения на распределение по размерам нано- и микрочастиц в сыворотке животных, получаемые методом лазерной корреляционной спектроскопии* (рисунки 3 – 5). Данные представлены в виде процентного вклада в светорассеяние частиц с радиусом от 1,9 до 545,1 нм. Кстати, эти рисунки подписаны как «гистограммы», однако на самом деле это линейные графики, а не столбики. Недостатком метода лазерной корреляционной спектроскопии является невозможность оценить истинную концентрацию частиц. Меняющийся вклад в

светорассеяние частиц разного размера трактуется в литературе на основе многочисленных клинических наблюдений как аллергоподобные, дистрофиоподобные, аутоиммуноподобные и др. изменения гомеостаза. В связи с этим, рассуждения автора о накоплении частиц того или иного размера теряют смысл. Действительно, в тексте диссертации частенько встречается подмена понятия соотношение между количеством частиц разного размера (их вклад в светорассеяние) понятием число частиц или накопление частиц (их концентрация). На основании этих данных составлена таблица 9, которая озаглавлена «Площади под кривыми...». Однако, по условиям представления данных методом лазерной корреляционной спектроскопии площадь под всеми получаемыми спектрами одинакова и составляет 100%. К тому же, площадь не может выражаться отрицательными числами. Размерность приведенных в таблице величин не указана. Надо полагать, что в таблице представлена разница между значениями контроля и опыта, взятыми из спектров.

На основании данных таблицы 9 автор делает вывод о большей или меньшей адаптированности разных линий мышей к облучению. Даже если не учитывать замечания, высказанные выше к данной таблице, возникает вопрос, о какой адаптированности может идти речь, если мыши не адаптировались к радиации, а лишь подвергались однократному тестирующему воздействию в дозе, близкой LD_{50} ? Здесь можно рассуждать лишь о высокой или низкой радиорезистентности у разных линий мышей по анализируемому показателю. В заключение этого раздела (3.1.1) автор вновь необоснованно пишет о «...повышении количества частиц среднего и большого размера в опытных группах...».

Более уверенным и принятым показателем чувствительности к радиации является изменение лейкоцитарной формулы крови. Обнаруженные после облучения сдвиги позволили автору надежно интерпретировать их как начало развития воспалительного ответа в организме и нарушение процесса созревания клеток в костном мозге. Одним из результатов является заметное снижение количества лимфоцитов в крови всех линий мышей после облучения. Автор с помощью проточной цитометрии получила более детальную картину происходящих в этой популяции клеток изменениях. Было показано, что в одних линиях (101) падает содержание только В-лимфоцитов, а в других (СЗН и С57В1) – как В-, так и Т-лимфоцитов, что автор объясняет с учетом данных геномной базы экспрессии соответствующих генов у этих линий. В целом удалось продемонстрировать нарушение иммунологической реактивности у мышей после облучения, чреватое отдаленными отрицательными последствиями. Следует обратить внимание на «проглатывание» ключевых слов при описании результатов. Например, когда речь идет о

снижении концентрации В-клеток автор ограничивается выражением «уменьшение В-клеток» (автореферат, стр. 13), что имеет совершенно другой смысл.

Большой раздел работы (3.2) посвящен изменениям морфологической картины различных органов мышей после облучения. Для исследования были избраны органы, обладающие различной радиочувствительностью, возрастающей в ряду: печень – поджелудочная железа – селезенка. При анализе повреждений печени выявилась наибольшая радиорезистентность у мышей линии С57В1, средняя – у С3Н и низкая – у 101. Ткани поджелудочной железы и селезенки исследованы у мышей линии С57В1. Показано, что признаки атрофии в поджелудочной железе через 3 и 6 недель после облучения встречались в 50 и 67% случаев. Морфологические изменения селезенки существенно уменьшались с 3-й по 6-ю недели опыта. Автор отмечает аналогию такой динамики с содержанием Т-лимфоцитов.

Небольшой критики заслуживает формулировка названия раздела 3.2: Исследование эффектов облучения на органно-структурно-функциональный уровень. Во-первых, облучение действует на орган, а не на уровень, а во-вторых, никаких функций органов не исследовалось, поэтому слово «функциональный» здесь неуместно.

На уровне организма эффекты γ -облучения исследовались по изменению массы тела и поведенческим параметрам в «открытом поле». На рис.18 представлены изменения прироста массы тела мышей в течение 6 недель после облучения. 3 исследованных линии по этому показателю ведут себя по-разному: у одних (С3Н) прирост выравнивается с контролем к 4-й неделе, у других (С57В1) не достигает контрольного уровня и через 6 недель, а у третьих (101) превышает контроль через 6 недель. Последний результат автор трактует как возможное развитие метаболического синдрома, однако следует иметь в виду, что анализируется прирост, а не масса тела, которая у этих облученных животных может и не превышать уровень контроля, поскольку в первые дни после облучения прирост падал.

В отношении поведенческих характеристик делается заключение, что горизонтальная активность животных не меняется после облучения. Что касается вертикальной активности, то автор указывает, что она меняется у всех трех линий животных через 3 недели после облучения, однако на соответствующем рисунке 20 показана достоверность отличий только для одной линии мышей. Показатель «время в покое» (табл. 13, по-видимому, данные представлены в секундах) меняется лишь через 1 неделю после облучения у двух линий мышей. В итоге, наибольшее количество изменений поведения зафиксировано у мышей линии 101, что трактуется как повышение

беспокойства, стрессорного ингибирования исследовательской активности и «усталости» в результате облучения.

В главе 4 диссертации приведены данные наземного эксперимента, имитирующего отдельные факторы космического полета. Анализ изменения распределения размера нано- и микрочастиц в плазме крови представлен в той же форме, что и рисунки 3 – 5 в главе 3. Рассматривается влияние однократного облучения дозой 0,05 Гр в течение последующих 4 недель, а также влияние антиортостатического вывешивания, моделирующего эффекты микрогравитации, длящегося в течение 4 недель. Здесь также встречаются некорректные выражения, например (стр. 88): происходит «небольшое увеличение частиц крупного размера». Увеличение чего: размера, концентрации? Ни то, ни другое не подходит.

Результаты космического эксперимента представлены в главе 5. Методом лазерной корреляционной спектроскопии определено соотношение нано- и микрочастиц плазмы крови после завершения месячного космического полета у мышей C57Bl. Существенной разницы по этому показателю при сравнении с мышами контрольной группы, содержащимися в земных условиях, не обнаружено, так же как и у мышей через 7 суток после полета. Здесь также имеются некорректные выражения: «повышение крупных частиц» (стр. 92), «повышение частиц крупного радиуса» (стр. 93) и др. Аналогичная ошибка встречается и в формулировке вывода 4 диссертации: «...приводит к возрастанию содержания высокомолекулярных частиц...».

В этой главе представлены результаты еще одного модельного эксперимента по выявлению эффекта адаптации к ионизирующей радиации на уровне клеток костного мозга. Оценивалась доля клеток с поврежденной ДНК в общем пуле клеток, что выражалось как индекс апоптоза. В качестве адаптирующего воздействия клетки облучали однократно дозой 0,05 Гр, а в качестве тестирующего, повреждающего – дозой 0,5 Гр. Сравнивались клетки мышей после космического полета с клетками животных виварного контроля. Показано, что «полетные» клетки более устойчивы к повреждающей дозе облучения, особенно после предварительной адаптирующей дозы. Это свидетельствует о наличии развитой системы радиационной защиты в клетках мышей, находившихся в условиях космического полета в течение 1 месяца. Однако и сама по себе адаптирующая доза вызывала у «полетных» клеток значительный прирост апоптозных ядер, что трактуется автором как сенсбилизация к излучению. Интересно, что в синхронном виварном контроле в клетках не вырабатывался адаптационный защитный ответ, по-видимому, вследствие недостаточности стимула, который состоял лишь из однократного воздействия низкой дозой. В этом случае в клетках развивалась аддитивная реакция,

суммирующая уровень апоптоза в результате воздействия обеими дозами облучения. Показано также, что в течение 8 дней реадаптации после космического полета явление радиоадаптивного ответа сохраняется.

В разделе «Заключение» автор анализирует и сопоставляет полученные результаты между собой и с данными других авторов, на основании чего формулирует **выводы**, которые в целом достаточно обоснованы, не вызывают существенных возражений и соответствуют поставленным цели и задачам исследования, а также полученным результатам.

Оценивая в целом проведенную Ю.С.Медведевой работу, следует сказать, что это масштабное и сложное исследование, которое позволяет оценить диссертацию как превышающую по объему, требующемуся для кандидатской. Что касается соискателя, то можно заключить, что автор работы – серьезный и перспективный специалист-патолог физиолог.

Сделанные в данном отзыве замечания и предложения являются «рабочими», направленными на более корректное представление данных в перспективе и не влияют на положительную в целом оценку диссертации.

Диссертация написана доступным научным языком, опечатки встречаются редко, иллюстративный материал оформлен аккуратно и понятно.

Достоверность полученных результатов обеспечивается корректной статистической обработкой данных, на основании чего автор имеет полное право делать надежные заключения по результатам своих исследований. Опубликованные Ю.С.Медведевой работы (в том числе 3 статьи в журналах из списка ВАК) содержат основные результаты и выводы, которые включены в текст диссертации.

Следует также подтвердить обоснованность заявления автора о **новизне** отдельных положений диссертации, что очевидно благодаря отсутствию аналогичных данных в научной литературе по теме работы, а также публикациям автора в рецензируемых научных журналах.

Автореферат отражает основные результаты и положения диссертации. К недостаткам автореферата следует отнести отсутствие списка сокращений.

По диссертационной работе Ю.С.Медведевой других, более значимых замечаний, которые могли бы изменить авторскую трактовку, сделанные выводы, а также обобщающую положительную оценку диссертации оппонентом, нет.

Заключение

Таким образом, диссертация Юлии Сергеевны Медведевой «Полисистемная оценка генетически обусловленной радиочувствительности организма (экспериментальное исследование)», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология, является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны новые теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области патофизиологии радиорезистентности. Представленная к защите диссертация соответствует предъявляемым к кандидатским диссертациям критериям, установленным «Положением о порядке присуждения учёных степеней», утвержденным постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, п. 9, а её автор Ю.С.Медведева, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Архипенко Юрий Владимирович
гл. науч. сотр. лаборатории адаптационной медицины,
доктор биологических наук, профессор
119192 Москва, Ломоносовский проспект, д.27, корп. 1
8-968-408-0310
arkhipenko@fbm.msu.ru



Ю.В.Архипенко

«Подпись проф. Ю.В.Архипенко заверяю».

Декан факультета фундаментальной медицины
ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В.Ломоносова»,
академик



В.А.Ткачук



10 мая 2017 г.