

ВІДГУК **офіційного опонента**

на дисертацію Курінного Д. А. "Модифікація радіаційно-індукованого мутагенезу в лімфоцитах периферичної крові людини *in vitro* з використанням атаксантину", представленої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика

Підвищення рівня онкологічної захворюваності в Україні в значній мірі пов'язане зі збільшенням екологічного, в тому числі радіаційного, навантаження на населення. За останні 20 років відмічається інтенсивне зростання кількості медичних радіологічних процедур, які на сьогодні є головним джерелом дії іонізуючих випромінювань на геном людини. Відповідно зростає чисельність персоналу, що задіяні у їх виконанні. Тому на даний час медичний персонал, у тому числі променеві діагности, радіаційні онкологи є найчисленнішою групою професіоналів, які працюють у сфері дії іонізуючої радіації. Завдяки впровадженню в практику цифрових технологій рентгенодіагностики променеве навантаження на персонал за останній час має виражену тенденцію до зниження. Але при цьому проблема виникнення стохастичних ефектів, в першу чергу злоякісних новоутворень радіаційного генезу залишається. На перший погляд вона відсторонена від уваги фахівців тривалим латентним періодом розвитку канцерогенезу та порівняно малими дозами опромінення як професіоналів, так і мешканців значних територій, забруднених радіонуклідами внаслідок Чорнобильської катастрофи. Відповідно до сучасних уявлень накопичення мутацій в клітинній популяції вважається потенційно онкогенним, а малі (надфонові) дози опромінення визнані канцерогенно небезпечними. Чинне місце у вирішенні/подоланні вищезазначеної проблеми має займати пошук та науково-практичне обґрунтування препаратів, які підсилюють радіорезистентність геному осіб, що зазнають дії іонізуючого випромінювання. Головними вимогами до радіозахисних препаратів залишається нетоксичність, висока ефективність за дії малих доз опромінення та їх натуральне походження. Саме цій актуальній проблемі генетики присвячена дисертаційна робота Курінного Д.А., яка спрямована на визначення особливостей та механізмів дії каротиноїду атаксантину на опромінені соматичні клітини людини.

Робота без сумніву актуальна, оскільки спрямована на захист геному високо радіочутливих імункомпетентних клітин людини – Т-лімфоцитів, відповідних за протипухлинний захист організму – і таким чином на мінімізацію канцерогенного ризику.

Дисертаційна робота Курінного Д.А. виконана в Державній установі «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії

медичних наук України» в межах НДР «Дослідження модифікації радіаційно–індукованого мутагенезу в лімфоцитах периферичної крові людини *in vitro* з використанням астаксантину» (2015-2017), № держ. реєстрації 0115U002696.

Робота викладена на 137 стор. машинописного тексту, ілюстрована 35 таблицями та 33 рисунками і має традиційну структуру зі всіма необхідними складовими (вступ, огляд літератури, детальний опис матеріалів та методів, результати власних досліджень та їх обговорення, висновки, список використаних літературних джерел - 210 найменувань).

У **вступі** розглядається актуальність теми дисертаційної роботи, значення отриманих автором результатів для теорії та практики генетичних досліджень, визначається наукова новизна одержаних даних. Чітко сформульована мета та п'ять задач для її досягнення. Відображено особистий внесок здобувача у виконанні дисертації. Вказано, що результати роботи доповідались на шести форумах високого рівня і достатньо повно (19 публікацій, з яких 11 статей, 1 глава монографії, 6 тез та патент на корисну модель) надруковані в профільних виданнях.

Зауваження до вступу. Бажано було обґрунтувати доцільність дослідження радіочутливості/радіорезистентності хромосом залежно від стадії клітинного циклу.

В розділі **огляд літератури**, який складається із 6 підрозділів, в логічній послідовності представлено особливості дії іонізуючого випромінювання на геном людини, сучасні класифікації радіомодифікаторів, детально описані фізико-хімічні та біологічні властивості астаксантину; представлена схема впливу препарату на внутрішньоклітинні процеси, які обумовлюють його більш високу ефективність в порівнянні з іншими радіопротекторами. Пошукувачем виконано поглиблений аналіз даних літератури стосовно закономірностей дії радіомодифікаторів, антиканцерогенних властивостей астаксантину. В цілому, розділ читається з великим інтересом і свідчить про знання автором наукових публікацій з досліджуваної проблеми.

Зауваження до розділу. Бажано більш детально розглянути стадії клітинного циклу Т-лімфоцитів, які є виключенням із правила Бергоньє – Трибондо. Тобто знаходячись у циркулюючому пулі крові в інертному стані (стадії покою G₀) вони виявляють гіперчутливість до опромінення. Крім того, доречно було хоча б коротко окреслити особливості радіаційного мутагенезу, так як це явище є ключовим в назві дисертаційної роботи. Зустрічаються деякі невдалі висловлювання: наприклад, «... каспази, які виконують функції як ініціаторів так і блокаторів» (стор.35), а коректно було б замість блокаторів написати ефекторів; «...предонкологічний стан опромінених клітин» замість «... стадії ініціації онтогенезу» та інші.

В розділі **матеріали і методи** описані методичні підходи, що використані автором. Робота виконувалася із залученням тест-системи лімфоцитів периферичної крові та методів цитогенетичного (метафазного) аналізу та електрофорезу окремих клітин Comet assay. Така методологія сприяла більш об'єктивній інтерпретації одержаних результатів, у тому числі поглибленому вивченню механізмів, які обумовили радіопротекторний ефект астаксантину.

Тільки під час виконання цитогенетичних досліджень було проаналізовано більше 23 тис. метафаз, що свідчить про їх великий обсяг. Особливо слід відмітити кропітку роботу дослідження стану клітин на сучасному наукову-методичному рівні при тест-опроміненні на різних стадіях мітотичного циклу. Це дало змогу не тільки констатувати радіопротекторний ефект астаксантину, але й розширити сучасні наукові уявлення про механізми реалізації радіаційно-індукованих ефектів на молекулярно-генетичному, хромосомному та клітинному рівнях. Розділ включає ілюстративні матеріали високої якості.

Зауваження до розділу. Цей розділ доцільно починати із дизайну дослідження з залученням всіх використаних методів на різних стадіях клітинного циклу лімфоцитів та вказати сумарну кількість спостережень. Так було б зручніше сприймати структуру та об'єм фактичного матеріалу.

В наступному розділі дисертації **«Результати власних досліджень та їх обговорення»** чітко, послідовно та логічно наведені результати власних досліджень пошукача Курінного Д.А. На першому етапі була визначена оптимальна концентрація астаксантину, який вводили в культуру лімфоцитів до опромінення. Приймаючи до уваги основну ідею та назву дисертації, найсуттєвішими результатами роботи вважаю наступні: вперше доведено та науково обґрунтовано радіопротекторну дію астаксантину, під впливом якого частота радіаційно-індукованих аберантних лімфоцитів та загальний рівень аберацій хромосом знижується майже в три рази за рахунок променевих маркерів – дицентричних хромосом. В рамках виконаного дослідження доведено, що ефективність радіопротектора залежить від ступеню радіочутливості клітин та концентрації препарату. Використання методів ДНК-комет (нейтральна версія) та хромосомного аналізу надало можливість розширити сучасні уявлення щодо формування радіаційно-індукованих ефектів на різних рівнях організації клітин. Запропонований сценарій досліджень дозволив виявити ключову роль апоптозу в формуванні кінцевих радіаційних ефектів за умов додаткового впливу астаксантину. Порівняно нижчий радіопротекторний ефект астаксантину на Т-лімфоцити крові учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС, які перенесли променеву хворобу I та II ступеню, вказує на індивідуальний підхід до призначення радіопротекторних препаратів.

Таким чином, в ході роботи було доведено, що астаксантин відповідає всім сучасним вимогам, які пред'являються до радіопротекторів, а саме він нетоксичний (LD 50 знайдено не було), високо ефективний та природного походження.

В цілому, принципових зауважень до викладання фактичного матеріалу немає.

Висновки повністю відповідають одержаним результатам та відображають рішення запланованих 5 завдань.

Наукова новизна одержаних результатів. Отримані результати розширюють сучасні наукові знання щодо можливостей цілеспрямованої модифікації радіаційно-індукованого мутагенезу в «індикаторних» соматичних клітинах людини. Вперше запропонована робоча гіпотеза, відповідно до якої радіозахисний ефект препарату астаксантину формується за рахунок активації процесів апоптозу в опромінених клітинах людини з високим рівнем пошкоджень геному.

Практичне значення роботи. Одержані результати, висновки та їх наукова обґрунтованість підкреслюють практичне значення роботи та свідчать про доцільність використання астаксантину з метою захисту геному опромінених осіб, що сприяє зниженню рівня канцерогенного ризику. На наш погляд застосування астаксантину у практику має бути однією зі складових первинної профілактики радіогенного раку.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій. Лабораторні дослідження виконані ретельно, вибрані методи досліджень і статистичного аналізу адекватні поставленим завданням. Достовірність отриманих даних не викликає сумніву. Високий ступень обґрунтованості 8 висновків обумовлений великим обсягом проведених досліджень, коректним використанням сучасних теоретичних уявлень в галузі генетики та фундаментальної радіобіології для інтерпретації отриманих результатів.

Автореферат повністю відображає зміст дисертації та заслуговує позитивної оцінки.

Питання, що виникли у процесі рецензування дисертаційної роботи, наступні:

-Чому Ви обрали найменш радіочутливу стадію клітинного циклу - стадію синтезу ДНК?

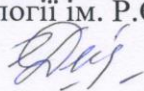
-Як Ви вважаєте, чи буде даний препарат проявляти радіопротекторні властивості за дії малих доз? А якщо так, то також шляхом активації процесів апоптозу? Адже відомо, що апоптоз – це процес дозо залежний.

-Ваша думка щодо відсутності радіозахисного ефекту астаксантину при опроміненні на найбільш радіочутливій фазі клітинного циклу G₂?

-Як Ви пояснюєте більш низьку ефективність препарату при його дії на опромінені *in vitro* лімфоцити пацієнтів, що перенесли гостру променеву хворобу? Адже рівень спонтанних та радіаційно-індукованих *in vitro* аберацій у лімфоцитів цих пацієнтів співпадає з аналогічними показниками у осіб, що не зазнавали тотального опромінення.

Зауваження та питання, що виникли у процесі рецензування дисертаційної роботи, не принципові та істотно не впливають на її науково-практичну значущість. Взагалі, дисертаційна робота дослідника Курінного Д.А. є зразком виконання науково-дослідних робіт в галузі сучасної радіаційної генетики.

Висновок. Вважаю, що дисертаційна робота Курінного Дениса Аркадійовича "Модифікація радіаційно-індукованого мутагенезу в лімфоцитах периферичної крові людини *in vitro* з використанням астаксантину" є завершеною науковою працею. За актуальністю, науковою новизною, обсягом і глибиною аналізу отриманих результатів, практичним значенням для профілактики розвитку радіогенних пухлин повністю відповідає вимогам, що висуваються до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – «генетика».

Офіційний опонент –
доктор біологічних наук
завідувач відділу біологічних ефектів
іонізуючого та неіонізуючого іпромінювання,
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України;  Дьоміна Е.А.

Вчений секретар
Інституту експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
канд. біол. наук  Воейкова І.М.

