

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Курінного Дениса Аркадійовича «Модифікація радіаційно-індукованого мутагенезу в лімфоцитах периферичної крові людини з використанням астаксантину», яка представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 - генетика

Актуальність теми. Актуальність обраної дисертантом теми не викликає сумнівів, оскільки ситуація, яка склалася внаслідок Чорнобильської аварії та зростання радіаційного навантаження на людину за рахунок розширення сфери використання іонізуючого випромінювання в промисловості й медицині все ще потребує проведення досліджень щодо віддалених наслідків негативного впливу цих факторів та розробки ефективних засобів мінімізації ранніх та віддалених проявів радіаційного ушкодження клітинних структур.

Більше 30 років минуло з моменту аварії на Чорнобильській АЕС, але з часом актуальність досліджень з приводу негативного впливу іонізуючого випромінювання на геном людини та мінімізації його наслідків не стає меншою, підтвердженням чого є події 2011 року, коли внаслідок землетрусу та цунамі сталася друга за величиною в історії людства катастрофа на АЕС Фукусима-1 в Японії. За даними на 2017 рік збиток склав від 189 до 300 млрд. доларів. Очікується, що на ліквідацію наслідків аварії і виведення станції з експлуатації буде потрібно близько 30 років. Компенсації потребує 80000 осіб – це приблизно 130 млрд. доларів США.

На сьогодні, незважаючи на велику кількість наукових праць, механізм формування віддалених наслідків опромінення в малих дозах все ще залишається остаточно не з'ясованим. Вважається, що ключовою ланкою цих процесів є ураження генетичного апарату клітин та порушення клітинної проліферації. Специфіка впливу іонізуючого випромінювання в малих дозах на геном клітини полягає в переважному утворенні точкових мутацій на рівні ДНК та перебудов на рівні субсегментів хромосом, а саме: стабільних (реципрокних транслокацій, інверсій) та нестабільних (дицентрики, кільця) в статевих клітинах і клітинах периферичної крові. А одним із факторів, що обумовлює збереження хромосомних змін у віддалений період Чорнобильської катастрофи, може бути зниження інтенсивності репараційних процесів, які в умовах дії малих доз радіації або зовсім не індукуються, або відбуваються з меншою ефективністю, що в свою чергу, призводить до формування систем нестабільності геному і підвищення ризику реалізації мультифакторіальної патології, в тому числі онкологічних захворювань.

Тому, не викликає сумніву, що вищенаведене обумовлює розробку сучасних методів прогнозування негативних наслідків такого впливу та пошуку й впровадження нових

безпечних та ефективних засобів для профілактики і лікування променевих уражень людини.

Одним з найбільш апробованих та розповсюджених методів оцінки радіаційного ураження генетичного апарату клітин є цитогенетичний аналіз. А використання дисертантом комбінації класичних цитогенетичних методів (G2- та G0 – radiationsensitivity assays) та молекулярно-генетичного методу електрофорезу окремих клітин (Comet assay) на одній і тій же модельній системі (культури лімфоцитів периферичної крові людини), опроміненої на різних стадіях мітотичного циклу в дозі 1,0 Гр дало можливість провести оцінку впливу як мутагенів, так і факторів, модифікуючих дію мутагенних чинників на стабільність геному, а також отримати дані, що свідчать про потужний генопротекторний ефект астаксантину при радіаційно-індукованому мутагенезі.

Саме тому дисертаційна робота Курінного Д.А., присвячена визначенню впливу астаксантину на частоту аберацій хромосом та показники пошкодження ДНК в лімфоцитах периферичної крові людини при дії іонізуючого випромінювання *in vitro.*, є безумовно актуальною та своєчасною.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій та зв'язок роботи з іншими науковими програмами.

У дисертаційній роботі Курінного Д.А. надане серйозне обґрунтування представлених наукових положень на підставі результатів досліджень з використанням сучасних високоінформативних цитогенетичних і молекулярно-генетичних методів.

В цілому дисертаційна робота виконана на високому методологічному рівні з використанням експериментальних методів дослідження, адекватних поставлених задач, з чітким дотриманням описаних у літературі та стандартних протоколах процедур щодо кожного застосованого методу.

Особисто дисертантом або за його безпосередньої участі проведено від 38 до 43 експериментів на кожну обстежену особу як контрольної групи, так і учасників ліквідації наслідків аварії на Чорнобильській атомній станції. Всього під час виконання цитогенетичних досліджень *in vitro* було проаналізовано 21145 метафаз, з них 2370 метафаз учасників ліквідації наслідків аварії на Чорнобильській атомній станції. За допомогою методу Comet assay проаналізовано від 5900 до 10700 (11000) клітин на 1 людину.

Основні наукові положення закономірно впливають зі змісту дисертації, переконливо обґрунтовані та базуються на вірогідних результатах досліджень, проведених автором. Достовірність аналізу матеріалу забезпечена використанням сучасних, адекватних меті та завданням роботи, методів. Висновки дисертації відображають основні результати роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота 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.

Наукова новизна одержаних результатів полягає в тому, що за результатами аналізу та узагальнення даних власних досліджень дисертантом вперше в Україні проведено аналіз радіаційно-індукованих *in vitro* пошкоджень геному соматичних клітин людини на різних стадіях клітинного циклу за допомогою паралельного використання цитогенетичних та молекулярно-генетичних (Comet assay) методів дослідження

Використані дисертантом оригінальні підходи дозволили виявити та довести роль астаксантину як модифікуючого чинника радіаційно-індукованих *in vitro* цитогенетичних та молекулярно-генетичних порушень в ЛПК людини та одержати нові дані щодо його антимутагенної та радіозахисної дії. Вперше проведено порівняння особливостей радіаційно-індукованих та модифікованих астаксантином *in vitro* частот аберацій хромосом та рівня пошкоджень ДНК окремих клітин на G₀, S та G₂ стадіях клітинного циклу та виявлено зростання частоти клітин в стані апоптозу при дії астаксантину на опромінені *in vitro* соматичні клітини людини, що може свідчити про активацію систем запрограмованої клітинної загибелі в лімфоцитах з високим рівнем геномних пошкоджень. Отримані автором дані суттєво розширюють знання щодо шляхів модифікації антиоксидантними речовинами радіаційно-індукованих порушень геному соматичних клітин людини.

Теоретичне і практичне значення результатів дослідження. Дані отримані дисертантом мають велике практичне значення, оскільки запропонована автором методична комбінація дає можливість багатофакторного аналізу як рівня пошкоджень геному, так і активності систем репарації та супресії, що може бути ефективно використано для визначення прихованої геномної нестабільності, при проведенні біодозиметричних досліджень та для поглибленого медичного контролю за особами, які зазнали впливу мутагенних факторів (отримано патент на корисну модель № 124259 «Спосіб комплексної оцінки пошкоджуваності геному та функціонування репараційних систем в соматичних клітинах людини»). Окрім цього, автором була запропонована власна модифікація методу кометного електрофорезу, що дозволило контролювати зміну частоти апоптозів та рівень пошкоджень ДНК на різних стадіях мітотичного циклу. Показана перспективність паралельного застосування класичних цитогенетичних методів (G₂- та G₀ – radiationsensitivity assays) та методу електрофорезу окремих клітин

(Comet assay) для оцінки наслідків радіаційної дії на геном соматичних клітин людини. Крім того, отримані результати дають можливість оцінити механізм радіозахисного впливу речовин та особливості їх дії на різних стадіях клітинного циклу. Нові дані щодо потужних генопротекторних властивостей каротиноїду атаксантину *in vitro* при дії іонізуючого випромінювання на соматичні клітини людини відкриває перспективу для його практичного використання.

В той же час, як на мене, не використано весь потенціал практичної значущості застосованих підходів до виконання досліджень та отриманих результатів. Як справедливо зазначено автором, результати роботи дають можливість підійти до розробки радіопротекторних препаратів на основі атаксантину - речовини природного походження, безпечної для людини, з високим рівнем антиоксидантної активності та потужною антимутагенною дією. Тому, на мою думку, теоретичні положення дисертаційної роботи та практичні напрацювання мали б бути впроваджені в практику лабораторій та установ, що займаються вивченням негативного впливу іонізуючого випромінювання на геном людини для визначення прихованої геномної нестабільності та для поглибленого медичного контролю за особами, які зазнали впливу мутагенних факторів або таких, що працюють на об'єктах підвищеної радіаційної небезпеки. Отримані дані щодо радіопротекторних властивостей атаксантину могли бути використані для розробки ефективних радіозахисних речовин з метою мінімізації ранніх та віддалених проявів радіаційного ушкодження клітинних структур.

Оцінка структури, змісту та завершеності дисертаційної роботи.

В цілому дисертація Курінного Д.А. побудована відповідно до вимог ДАК МОН України. Робота викладена на 132 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 35 таблицями та 33 рисунками і містить вступ, огляд літератури, детальний опис матеріалів та методів, результати власних досліджень та їх обговорення, аналіз та узагальнення одержаних даних, висновки, список використаних літературних джерел – усього 210 найменувань. Чітко визначено мету та 5 завдань досліджень, охарактеризовано наукову новизну та практичну цінність роботи.

У **Вступі** автор обґрунтовує актуальність роботи, та викладає положення, що створюють передумови до формування мети й задач дослідження.

В розділі **“Огляд літератури”** автором надані сучасні наукові дані щодо дії іонізуючого випромінювання на генетичний апарат клітин, обґрунтовується вибір Т-лімфоцитів як тест-об'єкту при проведенні цитогенетичних досліджень впливу іонізуючої радіації на геном соматичних клітин людини на різних стадіях клітинного циклу. Далі наведена загальна характеристика й існуючі класифікації радіопротекторів, в тому числі атаксантину.

Окрему увагу автор приділяє обґрунтуванню, чому саме астаксантин обрано для вивчення модифікуючого впливу на частоту аберацій хромосом та показники пошкодження ДНК в лімфоцитах периферичної крові людини при дії іонізуючого випромінювання *invitro*. Так показано, що саме астаксантин відповідає всім вимогам, які пред'являються до радіопротекторів - низька токсичність, висока антирадикальна та антиоксидантна активність, антиканцерогенний ефект, здатність проявляти дію як на рівні клітинної мембрани так і в середині клітини. Це, в свою чергу, дозволило припустити наявність у нього антимутагенної активності та можливість його використання в якості ефективного радіозахисного засобу.

Огляд літератури автор завершує характеристикою процесів апоптозу та коротко описує сучасні дані щодо антиканцерогенних властивостей астаксантину.

У розділі **Матеріали та методи дослідження** автором детально описані використані цитогенетичні та молекулярно-генетичні методи, в тому числі Comet assay, що відрізняється високою чутливістю при визначенні відносної частоти одно- та дво-ланцюгових розривів ДНК в кожній окремо взятій клітині та який використовують для кількісної оцінки ступеня пошкодження ДНК.

Необхідно зазначити, що особистодисертантом або за його безпосередньої участі проведена досить складна і кропітка робота, яка включала до 11-16 експериментів на 1 обстежуваного при цитогенетичному та до 27 при молекулярно-генетичному дослідженнях. Загалом до 43 експериментів на кожну обстежену особу як контрольної групи, так і учасників ліквідації наслідків аварії на Чорнобильській атомній станції

Всього під час виконання цитогенетичних досліджень *in vitro* було проаналізовано 21145 метафаз, з яких 3570 – без додавання астаксантину; 3700 - з додаванням астаксантину без опромінення, 7265 – при окремій дії іонізуючого випромінювання та 6610 при сумісній дії іонізуючого випромінювання та астаксантину.

При цитогенетичному обстеженні учасників ліквідації наслідків аварії на Чорнобильській атомній станції було досліджено 2370 метафаз.

За допомогою методу Comet assay проаналізовано в середньому 11000 клітин на 1 людину.

Результати досліджень викладено у розділі 3 та 14 підрозділах, які повністю розкривають сутність проведених досліджень. Матеріал ілюстровано таблицями та рисунками, легко сприймається.

У дисертаційній роботі визначено частоти цитогенетичних (хромосомні аберації) і молекулярно-генетичних (пошкодження ДНК, клітин в стані апоптозу) показників в ЛПК умовно здорових волонтерів на різних стадіях клітинного циклу – фонові, при дії

астаксантину в різних концентраціях, при опроміненні гамма-квантами ^{137}Cs в дозі 1,0 Гр, при сумісній дії опромінення та атаксантину в концентрації 20,0 мкг/мл.

За результатами цитогенетичних досліджень показано, що застосування атаксантину *in vitro* в концентрації 20,0 мкг/мл призводило до суттєвого зменшення частоти аберацій хромосомного типу (з $23,02 \pm 1,20$ до $7,76 \pm 0,71$) тільки при опроміненні культури лімфоцитів на G_0 стадії клітинного циклу. Використання атаксантину при опроміненні культури лімфоцитів на S та G_2 стадіях клітинного циклу не змінювало рівня цитогенетичних маркерів радіаційного впливу.

За допомогою методу Comet assay встановлено зростання частот пошкоджень ДНК в лімфоцитах периферичної крові людини при дії іонізуючого випромінювання в дозі 1,0 Гр та доведено захисний вплив атаксантину *in vitro* в концентрації 20,0 мкг/мл. Крім того, одним із вперше зафіксованих факторів впливу атаксантину на опромінену культуру лімфоцитів крові людини було зростання частоти зустрічаємості клітин в стані апоптозу. За результатами роботи встановлено роль атаксантину як модифікуючого чинника радіаційно-індукованих *in vitro* цитогенетичних та молекулярно-генетичних порушень в ЛПК людини та одержано нові дані щодо його антимуутагенної та радіозахисної дії на різних стадіях клітинного циклу.

Одержані результати узагальнено та ретельно проаналізовано з використанням адекватних статистичних методів.

Робота завершується обґрунтованими коректними висновками (8) щодо модифікуючого впливу атаксантину на радіаційно-індуковані цитогенетичні та молекулярно-генетичні порушення в соматичних клітинах людини в залежності від стадії клітинного циклу та відображають основні положення дисертації й відповідають сформульованим автором меті й завданням дослідження.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. Матеріал основних розділів дисертації викладено в опублікованих за результатами дисертації 12 друкованих працях (фахових наукових виданнях, внесених до переліку ДАК МОН України, міжнародних журналах), 6 тезах матеріалів наукових форумів, оформлено 1 патент на корисну модель.

Відповідність автореферату щодо змісту і оформлення дисертації. Автореферат повністю відповідає змісту дисертаційної роботи. Основні положення дисертації та її висновки ідентичні за змістом автореферату, а оформлення дисертації та автореферату відповідає вимогам ДАК МОН України.

Рекомендації щодо використання результатів дослідження в практиці. Як уже зазначалось вище, отримані дисертантом результати є підґрунтям для подальшого впровадження в практику лабораторій та установ, що займаються вивченням негативного

впливу іонізуючого випромінювання на геном людини для визначення прихованої геномної нестабільності, при проведенні біодозиметричних досліджень та для поглибленого медичного контролю за особами, які зазнали впливу мутагенних факторів, а також можуть бути використані для розробки ефективних радіозахисних речовин з метою мінімізації ранніх та віддалених проявів радіаційного ушкодження клітинних структур.

При рецензуванні дисертаційної роботи виникли деякі зауваження та побажання.

Зокрема, в огляді літератури зустрічаються посилання на прізвище автора без вказання ініціал (стор.31). Назва підрозділу та основний текст відокремлені та розташовані на різних сторінках (стор.20 - 21). Від сторінки до сторінки варіює відступ першого рядку абзацу (стор.22, 23, 36). Зустрічаються граматичні помилки або так звані русизми. Наприклад, в назві підрозділу «Радіопротектори. Загальна характеристика, існуючі класифікації» необхідно писати «...класифікації, що існують» (стор.24). На мою думку, не зовсім вдалий підпис під Рисунком 2 «Схематичне порівняння положення атаксантину в клітинній мембрані [133]», не зрозуміло що з чим порівнюється.

В розділі Матеріали та методи досліджень окремі зауваження викликає чисельний склад групи обстеження, сформованої для дослідження модифікуючого впливу атаксантину. Незважаючи на велику кількість проведених експериментів та проаналізованих клітин при виконанні цитогенетичних та молекулярно-генетичних досліджень, вважаю, що чисельність групи умовно здорових волонтерів та групи учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС мала б бути більшою. Для більш коректної оцінки модифікуючого впливу атаксантину на радіаційно-індуковані генетичні порушення в соматичних клітинах людини на різних стадіях клітинного циклу варто було б розширити вибірку осіб, що обстежувались. Причому, розширити ці групи можна було б вже після серії трудомістких пошукових експериментів, що проводились для визначення оптимальної робочої концентрації атаксантину та на етапі, коли було встановлено суттєве ослаблення негативної дії іонізуючого випромінювання на G0 стадії й відсутності радіозахисного ефекту на S та G2 стадіях клітинного циклу.

В цілому розділ 3 «Результати дослідження» написаний досить грамотно і чітко.

Проте, в Таблиці 2.2 рядок з порядковими номерами стовпчиків йде після показників особи I (стор.51).

На сторінці 56 є посилання на Рисунок 4, однак самого рисунку немає. Перший рисунок в Розділі 3 пронумерований як 7, хоча мало б бути Рис.3.1. Місцями не витримані поля тексту, а особливо таблиць, що суперечить чинним Вимогам до оформлення дисертації. Думаю, слід було представити деякі таблиці на сторінках

альбомного формату або навіть винести в Додаток.

За результатами дослідження автором було визначено зниження модифікуючого ефекту атаксантину та можливості його впливу на розвиток хромосомної нестабільності у осіб, які перехворіли на ГПХ та наведене пояснення цьому якможливе загальне виснаження внутриклітинних систем контролю репарації та супресії у осіб з цієї групи. Проте, в жодному висновку це не вказано, хоча отримано досить цікаві дані щодо особливостей впливу атаксантину на ЛПК у осіб, які перехворіли на ГПХ.

Крім того, хоча це не є обов'язковою умовою, але на мою думку, варто було надати узагальнення та обговорення результатів дослідження окремим підрозділом.

При рецензуванні дисертаційної роботи виникли наступні запитання.

1. Чому саме така кількість осіб обрана для проведення досліджень? Чи вважаєте Ви достатньою таку чисельність для отримання коректних висновків щодо оцінки модифікуючого впливу атаксантину на радіаційно-індуковані генетичні порушення в соматичних клітинах людини на різних стадіях клітинного циклу?
2. Окрім патенту на корисну модель, чи були ще якісь розробки, рекомендації тощо щодо впровадження в практику отриманих результатів при проведенні біодозиметричних досліджень, поглибленого медичного контролю за особами, які зазнали впливу мутагенних факторів, а також для розробки ефективних радіозахисних речовин з метою мінімізації ранніх та віддалених проявів радіаційного ушкодження клітинних структур?
3. Чи співставні контрольна група та вибіркаопромінених осіб за статеві-віковим розподілом та іншими параметрами (наприклад, наявністю шкідливих звичок)?
4. Чи проводили ви порівняльний аналіз цитогенетичних показників та результатів молекулярно-генетичного дослідження? Якщо ні, то чому?

Дисертація Курінного Д.А. в цілому написана професійно,грамотно, легко читається, з логічною й послідовною манерою викладення матеріалу. Дисертант показав справжню обізнаність у всіх питаннях, що порушені у роботі, а сама дисертація свідчить про глибокі знання автора в цій галузі, вміння поставити завдання, методично їх вирішувати та об'єктивно оцінити отримані результати. Принципових зауважень до роботи немає, є лише незначні недоліки, зокрема стилістичні, орфографічні помилки, невдало сформульовані речення, а також ті, що були вже відзначені по ходу аналізу певних розділів. Усі зазначені недоліки та питання, які виникли в процесі рецензування, не впливають на позитивне враження від роботи та не зменшують її теоретичного та практичного значення.

Висновок.

Вважаю, що дисертаційна робота Курінного Дениса Аркадійовича «Модифікація радіаційно-індукованого мутагенезу в лімфоцитах периферичної крові людини з використанням астаксантину» є завершеною науковою роботою. За актуальністю, новизною, глибиною, обсягом проведених досліджень і практичною цінністю дисертаційна робота Курінного Д.А. відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567., а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 - генетика.

Офіційний опонент –

начальник відділу молекулярної
біології і генетики,
ТОВ «Хімлаборреактив»
кандидат медичних наук



Ж.А.Мішаріна

Підпис Мішаріної Жанни Анатоліївни засвідчую

Директор

ТОВ «Хімлаборреактив»



В.І.Жолобіцький