

ВІДГУК

офіційного опонента
професора кафедри радіології Національної
медичної академії післядипломної освіти імені П.Л.Шупика МОЗ України
доктора медичних наук, професора,
заслуженого діяча науки і техніки України
Мечева Дмитра Сергійовича

на дисертаційну роботу Ільєнко І.М. “Генна регуляція апоптозу, проліферації та старіння імункомпетентних клітин людини у ранньому та віддаленому періодах після опромінення”, поданої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальностями
03.00.01 – радіобіологія, 03.00.15 – генетика

Детальний аналіз дисертації Ільєнко Ірини Миколаївни “Генна регуляція апоптозу, проліферації та старіння імункомпетентних клітин людини у ранньому та віддаленому періодах після опромінення” дозволяє сформулювати наступні узагальнені висновки щодо актуальності, ступеня обґрунтованості, основних наукових положень, висновків, рекомендацій, достовірності, наукової новизни, практичного значення, а також загальної оцінки роботи.

Актуальність теми дисертаційного дослідження.

Дисертаційна робота присвячена вирішенню актуальної науково-практичної проблеми у галузі радіобіології та генетики, а саме – з'ясуванню впливу зовнішнього опромінення у широкому діапазоні доз на генну регуляцію апоптозу, проліферації та старіння імункомпетентних клітин на послідовних етапах реалізації посттранскрипційних ефектів та формування радіаційно-індукованої імунологічної недостатності. Актуальність обраного напрямку досліджень обумовлена сучасними потребами радіаційної безпеки, наявністю віддалених медичних наслідків аварії на ЧАЕС, які простежуються і сьогодні та відсутністю єдиного погляду щодо генетичних механізмів формування пострадіаційних ефектів, що не безпідставно відзначається дисертанткою.

На тлі віддалених медичних наслідків аварії на ЧАЕС, які простежуються і сьогодні важливим є визначення біологічних маркерів радіаційного ураження, що підвищить ефективність діагностики радіаційних ефектів та професійного відбору. Вирішення цієї актуальної наукової та медичної проблеми потребує дослідження особливостей генної регуляції ключових гомеостатичних систем клітини на транскрипційному та трансляційному рівнях та визначення її значимості у формуванні ранніх та віддалених радіогенних ефектів в імунній системі після опромінення у широкому діапазоні доз.

Дисертація Ільєнко І.М. виконана в рамках самостійних та спільних науково-дослідних робіт відділу клінічної імунології Інституту клінічної радіології ННЦРМ, де авторка була відповідальним виконавцем. Частину досліджень виконано у рамках спільного міжнародного проекту з Бельгійським центром ядерних досліджень (SCK-CEN).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації та їх достовірність.

Наукові положення, висновки і рекомендації, які сформульовані в дисертаційній роботі Ільєнко І.М. достатньо обґрунтовані.

Метою роботи було розробити концепцію модифікуючого впливу іонізуючого випромінювання на генну регуляцію апоптозу, проліферації та старіння імункомпетентних клітин людини та обґрунтувати значення транскрипційно-трансляційних порушень у формуванні радіогенних ефектів в імунній системі у ранньому та віддаленому періодах після опромінення у широкому діапазоні доз. Для досягнення поставленої мети автором було вирішено низку конкретних, чітко сформульованих завдань.

Всі дослідження були виконані на достатньому клінічному матеріалі. У роботі проаналізовано та узагальнено результати досліджень у 500 осіб, обстежених у ранньому та віддаленому періодах після опромінення у широкому діапазоні доз. Сформовані адекватні групи порівняння та контролю.

Застосовано широкий спектр сучасних, високоспецифічних лабораторних методів досліджень, а саме – імунологічні, молекулярно-генетичні, культуральні, інформаційно-статистичні, аналітичні. Використані коректні методи статистичного аналізу отриманих даних.

Таким чином, об'єм проведених досліджень, вибір високоспецифічних методів та загальний науковий рівень дисертаційної роботи є цілком достатнім для вирішення дисертантом поставлених завдань і обґрунтування основних положень концепції модифікуючого впливу іонізуючого випромінювання на генну регуляцію апоптозу, проліферації та старіння імункомпетентних клітин людини та формування висновків дисертаційної роботи, що дозволяє оцінити їх як фундаментальні. Все вищезазначене дає підстави вважати отримані наукові результати цілком достовірними.

Наукова новизна дисертаційної роботи.

Вперше показано зв'язок генної експресії зі стабільними порушеннями імунної системи у віддаленому періоді після зовнішнього опромінення у дозовому інтервалі понад 100 мЗв, які визначаються через 25–27 років на груповому рівні.

Вперше встановлено вікові та дозозалежні порушення регуляції апоптозу на транскрипційному та трансляційному рівнях у лейкоцитах ПК УЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення, що проявлялось блокуванням запрограмованої клітинної загибелі, дозозалежним включенням антиапоптотичних білків та *TP53*-опосередкованим модулюючим впливом генів-інгібіторів апоптозу. У ранньому періоді після опромінення у межах професійних лімітів встановлено підвищену інтенсивність апоптозу в комплексі з активаційними реакціями на рівні зрілих клітин.

Вперше охарактеризовано особливості регуляції теломеро-теломеразного комплексу генами *TERT*, *TERF1*, *TERF2* у ранньому та віддаленому періодах після опромінення та визначено скорочення теломер лімфоцитів ПК людини в залежності від вікових та дозових меж. Вперше у віддаленому періоді після опромінення у дозовому інтервалі понад 500 мЗв показано зв'язок експресії гена

TP53 з активацією патогенетичних шляхів радіаційного старіння та генною регуляцією теломеразної активності в ІКК ПК УЛНА на ЧАЕС.

Вперше визначена односпрямованість змін експресії генів-регуляторів циклін-кіназного комплексу в ІКК ПК УЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення та працівників об'єкта «Укриття» у ранньому періоді після опромінення у межах професійних лімітів, що свідчить про зниження контролю над переходом від G₁ до S-фази клітинного циклу.

Вперше визначено особливості експресії генів-регуляторів апоптозу, клітинного циклу та старіння в CD4⁺, CD16⁺, CD19⁺, CD178⁺, CD57⁺, HLA-DR⁺ лімфоцитах ПК УЛНА на ЧАЕС в залежності від субпопуляційної належності у віддаленому періоді після опромінення.

Практичне значення одержаних результатів.

Незаперечним є практичне значення дисертаційної роботи. Результати досліджень дають можливість за допомогою параметрів генної експресії кількісно оцінити внесок радіаційного фактору у формування структурних порушень імунної системи людини у віддаленому періоді після опромінення.

Дослідження генної експресії у ранньому періоді після опромінення у працівників об'єкта «Укриття» дозволило запропонувати генетичні маркери для оцінки дії ІВ при професійному опроміненні, що відкриває шляхи до створення нових методів біологічної дозиметрії та оцінки ефективності лікувально-профілактичних заходів для відновлення імунної системи після опромінення.

На підставі результатів дисертаційної роботи розроблено та впроваджено у клінічну практику ННЦРМ методичні рекомендації та патенти.

Повнота викладення наукових положень, висновків та рекомендацій в опублікованих працях.

За матеріалами дисертації опубліковано 74 наукові праці у вітчизняних та міжнародних виданнях: розділів монографій – 7, статей у журналах – 16, статей у збірках наукових праць – 10, тез доповідей у матеріалах з'їздів та конференцій – 36, методичних рекомендацій – 1, отримано 4 патенти (1 деклараційний патент на винахід, 3 патенти на корисну модель). З цієї кількості 20 наукових праць опубліковано у наукових виданнях, які рекомендовано ДАК МОН України у галузі «біологічні науки» та включені до міжнародних наукометричних баз даних.

Основні положення дисертаційної роботи повідомлені і обговорені на національних та міжнародних науково-практичних конференціях та конгресах.

Результати дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на багаточисельних вітчизняних і міжнародних науково-практичних конференціях, симпозіумах, які були присвячені молекулярно-генетичним та радіобіологічним дослідженням. У дисертаційній роботі Ільєнко І.М. представлений їх детальний перелік, що свідчить про високу ступінь апробації результатів представленої наукової роботи.

Оцінка змісту дисертації та її завершеності.

Дисертація Ільєнко І.М. “Генна регуляція апоптозу, проліферації та старіння імунокомпетентних клітин людини у ранньому та віддаленому періодах після опромінення”, викладена на 311 сторінках друкованого тексту (215 сторінок

основного тексту), ілюстровано 64 рисунками і 31 таблицею. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, розділу опису матеріалів та методів досліджень, п'яти розділів власних досліджень, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних літературних джерел, який нараховує 414 посилань (48 – кирилицею, 366 – латиною).

У *вступі* автор переконливо обґрунтовує актуальність обраної теми, викладено мету та завдання дослідження; охарактеризовано наукову новизну та практичну цінність роботи; вказано на зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, визначено об'єкт та предмет дослідження; відмічено вагомий особистий внесок здобувача в розробку наукових досліджень, перераховано національні та міжнародні науково-практичні конференції та конгреси, де доповідались та обговорювались результати дисертаційної роботи.

Огляд літератури складається з 6 підрозділів, які з сучасних позицій дають уявлення про імунологічні, молекулярні-генетичні механізми порушень при дії іонізуючого випромінювання на клітинному та органному рівнях. Відбір літературних джерел та їх критичний аналіз свідчить про високий професійний рівень і наукову зрілість автора дисертації.

В огляді літератури розглянуто сучасний стан наступних наукових питань: вплив іонізуючого випромінювання на генетичний апарат клітини; клітинні та генетичні прояви радіаційно-індукованої нестабільності геному; систему клітинного реагування на радіаційний вплив (чекпойнти клітинного циклу, апоптоз, клітинне старіння); механізм генетичного регулювання клітинного циклу після опромінення; регуляція апоптозу; структурно-функціональна характеристика теломеро-теломеразного комплексу; старіння клітини, асоційоване із дією ІВ; моделюючий ефект генної експресії та активації сигнальних шляхів як спосіб реагування на дію ІВ. У даному розділі автор висвітлює сучасний стан обраної проблематики та перспективи подальшого вирішення дискусійних питань у дослідження молекулярно-генетичних механізмів впливу ІВ на ключові біологічні процеси, які є вирішальними у формуванні системних патологій та злоякісної трансформації.

У розділі *„Матеріали та методи досліджень”* докладно охарактеризовані матеріал дослідження, а саме групи обстеження (з належним дозиметричним супроводом) та використані методи дослідження. Дисертаційна робота виконана з використанням високотехнологічних та сучасних методів дослідження, які включають імунологічні (проточна цитофлуориметрія для дослідження імунологічного фенотипу лейкоцитів та запрограмованої клітинної загибелі лімфоцитів ПК), молекулярно-генетичні (дослідження відносної довжини теломер лімфоцитів ПК за допомогою flow-FISH методу, дослідження відносного рівня генної експресії методом ПЛР у реальному часі), культуральні (культивування лінії лейкемічних клітин K562 для реалізації методу flow-FISH), інформаційно-статистичні, аналітичні методи. Первинний аналіз даних проведений з використанням програмного забезпечення WinMDI 2.8. та CellQuestPro 5.1. (BD, США); SDS 2.3 та RQ Manager 1.2. (Applied Biosystems, USA). Статистичну обробку даних проводили за допомогою Statistica 10.0.

У розділах власних досліджень (розділи 3-7) автор наводить результати вивчення генної регуляції апоптозу, проліферації та старіння імунокомпетентних клітин людини у ранньому та віддаленому періоді після опромінення. Кожний розділ завершено логічним аналітичним підсумком отриманих результатів та списком наукових робіт, в яких висвітлені результати дослідження.

У розділі 3 охарактеризовано субпопуляційний склад та імунофенотиповий профіль імунокомпетентних клітин периферичної крові осіб у ранньому та віддаленому періодах після опромінення. Автором встановлено наявність сталих імунологічних порушень віддаленого періоду, індукованих радіацією на підставі визначених порушень TCR у комплексі зі змінами Т- та В-ланок клітинного імунітету та їх позитивною кореляцією з дозою опромінення. Встановлено, що у ранньому періоді після опромінення у межах професійних лімітів спостерігається підвищення експресії активаційних маркерів CD25 та HLA-DR на лімфоцитах периферичної крові, що може бути показником ранньої відповіді на вплив іонізуючого випромінювання.

У розділі 4 автор надає кількісну та якісну характеристику запрограмованої клітинної загибелі лімфоцитів периферичної крові працівників об'єкта «Укриття» та УЛНА на ЧАЕС 1986–1987 рр. в залежності від їх віку та дози опромінення. Здобувачем встановлені зміни, які свідчать про різний характер проявів апоптозу у ранньому та віддаленому періодах після опромінення, а саме: зміна співвідношення про- та антиапоптотичних білків у діапазоні доз до 500 мЗв залежить від дози та супроводжується входженням лімфоцитів в апоптоз. При більших дозах процес блокується дозозалежним включенням антиапоптотичних білків і не супроводжується на груповому рівні підвищенням числа анексин V⁺PI⁻ лімфоцитів, що свідчить про незавершеність апоптозу. В цьому дозовому діапазоні встановлено залежність апоптозу від віку, однак у групі осіб у ранньому періоді після опромінення у межах професійних лімітів таких залежностей встановлено не було. На фоні дисбалансу про- та антиапоптотичної регуляції запрограмованої клітинної загибелі у ранньому періоді після опромінення у межах професійних лімітів, встановлено ознаки інтенсифікації апоптотичних процесів в імунокомпетентних клітинах периферичної крові.

Розділ 5 присвячений аналізу відносної довжини теломер лімфоцитів периферичної крові працівників об'єкта «Укриття» та УЛНА на ЧАЕС 1986–1987 рр. в залежності від їх віку та дози опромінення. Автором продемонстровано скорочення відносної довжини теломер лімфоцитів периферичної крові у віддаленому періоді після опромінення в залежності від віку та дози опромінення. Цікавим фактом, встановленим у межах цього розділу є продемонстрований вплив на інтенсивність негативних зв'язків між дозою опромінення та відотною довжиною теломер лімфоцитів, комбінації вікових (40–50 років) та дозових ($100 < D < 1000$ мЗв) меж.

У ранньому періоді після опромінення автором продемонстрована лише тенденція до зниження показника відносної довжини теломер із віком. Також у ранньому періоді після опромінення у межах професійних лімітів, не виявлено статистично достовірної залежності відносної довжини теломер від дози опромінення. Однак, накладання вікових меж, а саме діапазон від 40 до 50 років

призводило до встановлення залежності негативного характеру між показником відносної довжини теломер та дозою опромінення.

У **Розділі 6** систематизовано численні результати досліджень, переважна більшість з яких містить генетичну складову, а саме охарактеризовано особливості регуляторних зв'язків між генною експресією та процесами апоптозу, проліферації та старіння імунотокміпетентних клітин периферичної крові осіб у ранньому та віддаленому періодах після опромінення.

Наведена характеристика експресії генів-індукторів та інгібіторів апоптозу – *TP53*, *TP53I3*, *BAX*, *BIRC5*, *FASLG*, *MADD*, *MKNK* у лейкоцитах периферичної крові працівників об'єкта «Укриття» та УЛНА на ЧАЕС 1986–1987 рр. в залежності від дози опромінення, визначено особливості експресії генів *TERF1*, *TERF2* та *TERT* – регуляторів довжини теломер імунотокміпетентних клітин периферичної крові обстежених осіб в залежності від віку та дози опромінення, охарактеризовано особливості експресії генів-регуляторів імунної відповіді та репараційних процесів *BRC11*, *DDB2*, *NFKB1*, *NFKB2* та генів-регуляторів сигнальної трансдукції та поділу *CCND1*, *CCN1A*, *CCN1B*, *CCN2A*, *CSF2*, *MAPK14*, *TGFBR1* у лейкоцитах периферичної крові працівників об'єкта «Укриття» та УЛНА на ЧАЕС 1986–1987 рр. в залежності від дози, надана характеристика експресії гена-регулятора ангиогенезу *VEGFA* у лейкоцитах периферичної крові осіб у ранньому та віддаленому періодах після опромінення.

Розділ 7 є вкрай цікавим за методичним підходом та отриманими результатами. У цьому розділі описані субпопуляційні особливості експресії генів-регуляторів апоптозу, клітинного циклу та старіння у лімфоцитах периферичної крові УЛНА на ЧАЕС. На рівні генної експресії у віддаленому періоді після опромінення автором встановлено паралельність змін в активованих лімфоцитах (HLA-DR⁺) та у популяціях цитотоксичних клітин (CD16⁺, CD57⁺). Не визначено змін, по відношенню до контрольної групи, у CD19⁺ субпопуляції. У комплексі отримані дані свідчать про наявність у віддаленому періоді після опромінення змін генної експресії в ефекторних субпопуляціях лімфоцитів периферичної крові.

У **заключному розділі (розділ 8)** представлено аналіз та узагальнення результатів дослідження, де автор підсумовує отримані дані та обмірковує їх значення для вирішення поставлених мети і завдань. Систематизація отриманих даних щодо ролі головних досліджуваних шляхів генної регуляції у формуванні ефектів опромінення в залежності від дози та віку, стало підґрунтям для запропонованої автором концепції «Концепція модифікуючого впливу іонізуючого випромінювання на генну регуляцію апоптозу, проліферації та старіння імунотокміпетентних клітин людини при формуванні ранніх та віддалених радіогенних ефектів в імунній системі в залежності від віку та дози опромінення» (**підрозділ 8.1**). Згідно з запропонованою концепцією, основу розвитку імунотокміпетентності та підвищення ризику клітинної трансформації у віддаленому періоді після впливу ІВ складають генетично опосередковані та пов'язані з дозою порушення механізмів функціонування ІКК, які полягають у незавершеності процесу апоптозу, дисбалансі експресії про- та антиапоптотичних генів; клітинному старінні та *TERT* пов'язаному ризику трансформації ІКК за

посередництвом гена *TP53*; порушеннях циклін-кіназної регуляції клітинного циклу, диференціювання та сигнальної трансдукції; збереженні радіогенних мутацій TCR та гіперекспресії генів *TP53*, *MAPK14*, *MKNK2*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2A*, *VEGFA* в ефекторних субпопуляціях лімфоцитів. У ранньому періоді після опромінення у професійних лімітах до 20 мЗв встановлено активацію захисно-компенсаторних процесів та включення патогенетичних шляхів радіаційного старіння *IKK* за рахунок порушень генної регуляції теломеротеломеразного комплексу та гіперекспресії антигенів пов'язаних із протівірусним імунітетом та протипухлинним наглядом.

Положення розробленої концепції стали безумовним придбанням дисертаційної роботи, новим вирішенням актуальної науково-технічної проблеми у галузі радіобіології та генетики, а саме – з'ясуванню впливу зовнішнього опромінення у діапазоні доз від професійних лімітів до 3100 мЗв на генну регуляцію апоптозу, проліферації та старіння імунокомпетентних клітин на послідовних етапах реалізації посттранскрипційних ефектів та формування радіаційно-індукованої імунологічної недостатності.

Подана дисертаційна робота завершується обґрунтованими **висновками**, які відповідають її змісту та повністю висвітлюють основні наукові результати. Загалом можна зазначити, що дисертація Ільєнко І.М. є закінченою науковою роботою, в якій отримані нові наукові результати, що мають теоретичну та практичну цінність. За науковим змістом і оформленням дисертаційної роботи вагомих зауважень немає.

При знайомстві з представленими автором результатами досліджень у рецензента виникли деякі дискусійні запитання:

1. Чим, на Вашу думку, обумовлена схожість деяких імунологічних та молекулярно-генетичних порушень, які Вами визначено як у ранньому так і віддаленому періодах після опромінення?
2. Чи вважаєте Ви охарактеризовані Вами зміни генної експресії пов'язаними із впливом саме радіаційного фактору?
3. У Вашій роботі представлений досить грамотний дозиметричний супровід обстежених осіб. Однак, чому Ви оцінювали вплив лише зовнішнього опромінення?

Заключення.

Дисертаційна робота Ільєнко І.М. „Генна регуляція апоптозу, проліферації та старіння імунокомпетентних клітин людини у ранньому та віддаленому періодах після опромінення”, є самостійною, завершеною науково-дослідницькою працею. Отримані результати дисертаційної роботи обґрунтовані та лягли в основу розробленої концепції модифікуючого впливу іонізуючого випромінювання на генну регуляцію апоптозу, проліферації та старіння імунокомпетентних клітин людини та вирішують поставлене завдання.

Зміст автореферату ідентичний матеріалам всіх розділів дисертації і повністю розкриває основні положення наукових досліджень, проведених

Ільєнко І.М. і викладених в дисертаційній роботі. Висновки, наведені в авторефераті, як за змістом, так і за формою ідентичні дисертаційному рукопису.

За своєю актуальністю, науковою новизною, практичною значущістю, обсягом та методичним рівнем виконаних досліджень представлена робота заслуговує високої оцінки і відповідає вимогам п.13 „Положення про порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вчених звань” ВАК України, що пред’являються до дисертаційних робіт, а її автор Ільєнко І.М. заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальностями 03.00.01 – радіобіологія, 03.00.15 – генетика.

Офіційний опонент

професор кафедри радіології

Національної медичної академії

післядипломної освіти імені П. Л. Шупика МОЗ України

доктор медичних наук, професор

заслужений діяч науки і техніки України



[Handwritten signature]

Мечев Д. С.

[Handwritten signature: Мечев Д. С.]
 АСВІДЧУЮ
 ІЙ СЕКРЕТАР