

## ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертаційну роботу Ільєнко Ірини Миколаївни «Генна регуляція апоптозу, проліферації та старіння імунотетентних клітин людини у ранньому та віддаленому періодах після опромінення», що представлена на здобуття вченого ступеня доктора біологічних наук за спеціальностями 03.00.01 – радіобіологія та 03.00.15 – генетика (біологічні науки)

**Актуальність теми.** У сучасному світі людина як і інші живі організми все більше піддаються впливу різноманітних джерел радіації. Це відбувається внаслідок використання ядерних технологій в промисловості, випробувань ядерної зброї, техногенних катастроф та з інших причин. Збільшуються ризики, пов'язані з імовірністю генетичних ушкоджень у живих організмів внаслідок дії іонізуючого опромінювання, гостро стоять питання генетичної безпеки і охорони здоров'я.

На жаль Україна має негативний досвід техногенних катастроф, пов'язаних із використанням ядерних технологій. Наслідки аварії на Чорнобильській АЕС, питання ядерної та радіаційної безпеки обумовлюють необхідність наукових досліджень у галузі радіаційної медицини та радіобіології.

Отже, тема дисертаційної роботи Ільєнко Ірини Миколаївни, присвячена дослідженню генної регуляції апоптозу, проліферації та старіння імунотетентних клітин людини у ранньому та віддаленому періодах після опромінення, є вкрай актуальною.

Детально дослідивши сучасний стан проблеми, І. М. Ільєнко поставила за мету розробити концепцію модифікуючого впливу іонізуючого випромінювання на генну регуляцію апоптозу, проліферації та старіння імунотетентних 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 мети автором було визначено коло завдань, що передбачали, зокрема, визначення особливостей експресії генів-регуляторів апоптозу, клітинного циклу та теломеро-теломеразного комплексу; дослідження апоптозу, відносної довжини теломер в лейкоцитах периферичної крові працівників об'єкта «Укриття» та учасників ліквідації аварії на ЧАЕС; дослідження особливостей регуляторних зв'язків між генною експресією та апоптозом, клітинним старінням і проліферацією імунотетентних клітин; визначення особливостей генної експресії у субпопуляціях лімфоцитів периферичної крові у віддаленому періоді після опромінення; з'ясування патогенетичного значення порушень генної регуляції апоптозу, клітинного циклу та теломеро-теломеразного комплексу у формуванні радіаційно-індукованих порушень в імунній системі у ранньому та віддаленому періодах після опромінення.

Об'єктом дослідження автором визначені генетичні ефекти дії іонізуючого випромінювання в імунній системі. Предметом дослідження були радіогенні зміни генної експресії, апоптозу, клітинного циклу та старіння імунокомпетентних клітин у ранньому та віддаленому періодах після опромінення.

Безсумнівно, дисертаційна робота І. М. Ільєнко вносить суттєвий вклад у вирішення важливої науково-прикладної проблеми радіобіології та генетики щодо генетичних наслідків іонізуючого випромінювання в імунокомпетентних клітинах людини у ранньому та віддаленому періодах після опромінення та формування радіаційно-індукованої імунологічної недостатності.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота І. М. Ільєнко є складовою частиною тематичного плану науково-дослідних робіт відділу клінічної імунології та радіаційної психоневрології Інституту клінічної радіології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» у рамках трьох тем та одного спільного проекту з Бельгійським центром ядерних досліджень 7-ї Рамкової програми Євратому.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій.** Для досягнення мети і завдань дисертаційної роботи автором застосовані адекватні, сучасні методи дослідження: імунологічні, молекулярно-генетичні, культури клітин, математичні, аналітичні. Значущість і обґрунтованість основних наукових положень і висновків дисертації, а також практичних рекомендацій базується на достатньому об'ємі експериментального матеріалу. Зроблені висновки теоретично обґрунтовані та цілком відповідають отриманим результатам.

**Наукова новизна роботи** полягає в тому, що дисертантом вперше встановлено зв'язок генної експресії з порушеннями імунної системи у віддаленому періоді (через 25–27 років) після іонізуючого опромінювання у дозовому інтервалі понад 100 мЗв, вперше встановлено вікові та дозозалежні порушення регуляції апоптозу на транскрипційному та трансляційному рівнях у лейкоцитах периферичної крові учасників ліквідації аварії на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення. З іншого боку, у ранньому періоді після опромінення у межах професійних лімітів встановлено підвищену інтенсивність апоптозу в комплексі з активаційними реакціями на рівні зрілих клітин.

Науковою новизною вирізняються дані автора про особливості регуляції теломеро-теломеразного комплексу генами *TERT*, *TERF1*, *TERF2* після опромінення та скорочення теломер у лімфоцитах периферичної крові людини в залежності від віку та дози опромінення. За опромінення у дозах понад 500 мЗв показано зв'язок між експресією гена *TP53* та активацією патогенетичних шляхів клітинного старіння і генною регуляцією теломеразної активності.

Новими є отримані автором дані про односпрямовані зміни експресії генів-регуляторів циклін-кіназного комплексу та зниження контролю G<sub>1</sub>-S-

переходу клітинного циклу. Також вперше досліджено особливості експресії низки генів-регуляторів апоптозу, клітинного циклу та старіння в лімфоцитах периферичної крові після опромінення.

Новою є запропонована автором концепція модифікуючого впливу іонізуючого випромінювання на генну регуляцію апоптозу, проліферації та старіння імунокомпетентних клітин при формуванні ранніх та віддалених радіогенних ефектів в імунній системі людини.

**Практичне значення отриманих результатів** полягає в тому, що за допомогою параметрів генної експресії можливо оцінити внесок радіаційного чинника у формування структурних порушень імунної системи людини у віддаленому періоді після опромінення; запропоновано генетичні маркери для оцінки дії радіації при професійному опроміненні, на основі чого можливо створення нових методів біологічної дозиметрії та оцінки ефективності лікувально-профілактичних заходів для відновлення імунної системи.

За участі дисертанта розроблено та впроваджено у клінічну практику чотири патенти України та методичні рекомендації.

**Оцінка змісту дисертації, її завершеності, зауваження до оформлення.** За обсягом і структурою дисертаційна робота І. М. Ільєнко відповідає вимогам МОН України і містить у собі всі необхідні розділи. Текст дисертації включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів та методів досліджень, результати і обговорення власних досліджень (5 розділів), аналіз і узагальнення результатів досліджень, висновки, практичні рекомендації, список використаної літератури. Дисертація викладена на 311 сторінках друкованого тексту (з них 215 сторінок основного тексту), містить 31 таблицю, 64 рисунки, список використаних джерел налічує 414 посилань.

У **вступі** дисертації обґрунтована актуальність досліджуваної наукової проблеми, показаний зв'язок теми з науковими програмами, планами, темами, в межах яких виконувалась дисертаційна робота, сформульовані мета і завдання дослідження, визначені наукова новизна і практичне значення отриманих результатів, приведені дані про особистий внесок здобувача, дана інформація про апробацію результатів роботи і кількість публікацій. Всі необхідні складові у даному розділі відображені достатньо повно.

**Розділ 1 «Огляд літератури»** відповідає за змістом обраній темі дисертації, складається з трьох підрозділів, в яких висвітлені питання про вплив іонізуючого випромінювання на генетичний апарат клітини, клітинні та генетичні прояви радіаційно-індукованої нестабільності геному; проаналізовано систему клітинного реагування на радіаційний вплив, чекпойнти клітинного циклу, апоптоз та клітинне старіння, важливі з огляду на бар'єрні механізми канцерогенезу. Досліджено дані літератури щодо модулюючого ефекту генної експресії та активації сигнальних шляхів як способу реагування на дію іонізуючого випромінювання.

В цілому, аналіз літератури викладено досить повно і детально. Важливо, що автор не тільки аналізує стан досліджуваних проблем, але

також вказує на питання, що потребують подальшого вивчення, тим самим обґрунтовуючи актуальність, теоретичне значення і новизну обраного власного напрямку досліджень.

У розділі 2 «Матеріал та методи дослідження» дисертант надав досить повні відомості про вихідний матеріал, умови та методи досліджень. Розділ містить інформацію про використані в роботі групи обстеження, серед яких контрольна, працівники об'єкта «Укриття» та учасники ліквідації аварії на ЧАЕС. Представлені дані про чисельність груп, вік обстежених, отримані дози опромінення та стан здоров'я.

Дано детальний опис методик експериментальних досліджень, зокрема, йдеться про визначення відносного рівня експресії диференційних та активаційних антигенів лейкоцитів периферичної крові людини, дослідження запрограмованої клітинної загибелі лімфоцитів, відносної довжити теломер лімфоцитів за допомогою flow-FISH методу. Дослідження відносного рівня генної експресії у лейкоцитах периферичної крові проведено з використанням полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі та TaqMan технології, дана характеристика досліджених генів. Надано опис методу магнітного сортування субпопуляцій лімфоцитів периферичної крові. Дано перелік статистичних методів та їх програмного забезпечення.

Наведені дані свідчать про те, що автор використовує у роботі достатньо значний за об'ємом експериментальний матеріал. Методи дослідження відповідають тим завданням, які автор вирішує у своїй роботі. В цілому, надана автором інформація свідчить про те, що дисертаційна робота виконана на належному науково-методичному рівні з використанням сучасних методів молекулярно-генетичного та цитологічного аналізу.

Наступні розділи присвячені результатам власних досліджень автора та їх обговоренню. Вони представлені у 5-ти розділах дисертації.

У розділі 3 «Характеристика субпопуляційного складу та імунофенотипового профілю імунокомпетентних клітин периферичної крові осіб у ранньому та віддаленому періодах після опромінення» дисертантом викладені дані, що свідчать про зростання середніх значень відсотка Т-хелперів у ранньому періоді після опромінення, а також у віддаленому періоді при дозах понад 500 мЗв порівняно з контролем. У віддаленому періоді встановлено позитивну кореляцію з дозою опромінення в інтервалі 100–500 мЗв за кількістю  $CD4^+8^+$  цитотоксичних Т-лімфоцитів. У ранньому періоді після опромінення у межах професійних лімітів показано підвищення експресії активаційних маркерів CD25 та HLA-DR на лімфоцитах периферичної крові. Описані процеси характерні для зрілих клітин, тоді як вміст ранніх клітин-попередників залишався без змін.

У віддаленому періоді після опромінення показано зміни у кількості  $CD38^+$  клітин-попередників у периферичній крові учасників ліквідації аварії на ЧАЕС, які отримали дози опромінення понад 500 мЗв, та підвищення вмісту TCR-варіантних Т-лімфоцитів.

Таким чином, дані, викладені у розділі 3, свідчать про наявність сталих імунологічних змін, пов'язаних з дією іонізуючого випромінювання у

віддаленому періоді та підсиленням адаптивної імунної відповіді у ранньому періоді після опромінення.

У **розділі 4** «Кількісна та якісна характеристика 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» автором представлені дані про зміни співвідношення про- та антиапоптичних білків у віддаленому періоді після опромінення у дозах до 500 мЗв, що супроводжується входженням лімфоцитів у апоптоз. За вищих доз процес блокується залежним від дози включенням антиапоптичних білків і незавершеністю апоптозу. Показано залежність запрограмованої клітинної загибелі від віку обстежених у віддаленому періоді після опромінення. У ранньому періоді при дозах у межах професійних лімітів такої залежності не виявлено. В даній групі обстежених встановлено ознаки інтенсифікації апоптичних процесів в імунокомпетентних клітинах на фоні дисбалансу про- та антиапоптичної регуляції запрограмованої клітинної загибелі.

Загалом представлені у розділі дані свідчать про різний характер проявів апоптозу у ранньому та віддаленому періодах після опромінення.

Значний інтерес представляють дані **розділу 5** «Аналіз 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 встановлено найбільше зниження відносної довжини теломер (RLT) у дозовому інтервалі до 100 мЗв. Зміни довжини теломер, за думкою автора, можуть свідчити про порушення кінцевої недореplikації теломер і становити підґрунтя для злоякісної трансформації клітини. Результати дослідження показали, що процеси регуляції довжини теломер лімфоцитів периферичної крові у осіб різних вікових груп мають відмінності у віддаленому періоді після опромінення. Між віком у межах 40–50 років та дозою опромінення у діапазоні 100–1000 мЗв показано негативний зв'язок між дозою опромінення та показником RLT. У ранньому періоді після опромінення у межах професійних лімітів не виявлено значимої залежності відносної довжини теломер від дози опромінення. Однак, у вікових межах 40–50 років така залежність проявлялась і мала негативний характер.

Важливим з точки зору реалізації мети дослідження є **розділ 6** «Характеристика регуляторних зв'язків між генною експресією та процесами апоптозу, проліферації та старіння імунокомпетентних клітин периферичної крові осіб у ранньому та віддаленому періодах після опромінення».

Розділ складається з п'яти підрозділів. Дисертант наводить характеристику експресії низки генів-індукторів та інгібіторів апоптозу, генів-онкосупресорів у лейкоцитах периферичної крові, аналізує особливості експресії генів-регуляторів довжини теломер та генів-регуляторів імунної відповіді та репарації у працівників об'єкта «Укриття» та учасників ліквідації аварії на ЧАЕС в імунокомпетентних клітинах периферичної крові в залежності від дози опромінення.

У **розділі 7** «Субпопуляційні особливості експресії генів-регуляторів апоптозу, клітинного циклу та старіння у лімфоцитах периферичної крові

УЛНА на ЧАЕС» автор наводить дані про однонаправлений характер змін на рівні генної експресії у віддаленому періоді після опромінення в ефекторних субпопуляціях лімфоцитів периферичної крові, зокрема, в активованих лімфоцитах (HLA-DR<sup>+</sup>) та у популяціях цитотоксичних клітин (CD16<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup>). Отримані результати свідчать про каскадний характер експресії генів та реакцію відповідних регуляторних систем на дію іонізуючого випромінювання. У той же час, у субпопуляції CD19<sup>+</sup> не виявлено змін відносно контрольної групи.

У **розділі 8** «Аналіз і узагальнення результатів досліджень» автор резюмує найбільш суттєві результати проведених досліджень та обґрунтовує їх актуальність, наукове і практичне значення. Результати роботи узагальнені у концепції модифікуючого впливу іонізуючого випромінювання на генну регуляцію апоптозу, проліферації та старіння імунокомпетентних клітин людини при формуванні ранніх та віддалених радіогенних ефектів в імунній системі в залежності від віку та дози опромінення.

**Висновки** відображують зміст дисертації, узгоджуються з отриманими результатами і відповідають меті та завданням дослідження.

**Практичні рекомендації** включають пропозиції щодо використання основних положень дисертаційної роботи у клінічній практиці для визначення імунопатологічних синдромів, пов'язаних з дією іонізуючого випромінювання.

Дисертацію та автореферат викладено доброю літературною мовою, вони містять значну кількість рисунків і таблиць, які полегшують сприйняття викладеного матеріалу. Автореферат за змістом відповідає дисертаційній роботі.

За даними автора за результатами дослідження опубліковано 74 наукові праці, у тому числі 7 розділів монографій, 16 статей у журналах та 10 статей у збірках наукових праць (з них 20 наукових праць у виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК Міністерства освіти і науки України та міжнародних наукометричних баз даних), 36 матеріалів і тез наукових конференцій, з'їздів, симпозіумів, одна методична рекомендація. Отримано 4 патенти України: 1 деклараційний патент на винахід та 3 патенти на корисну модель. Основні положення дисертації обговорювалися на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях, з'їздах, симпозіумах.

При рецензуванні дисертаційної роботи виникли певні зауваження і дискусійні запитання:

1. Вік обстежених у контрольній групі (середній вік:  $52,9 \pm 6,0$  років) не збігається з віком працівників об'єкта «Укриття» (середній вік:  $38,7 \pm 0,96$  років). Чи коректно порівнювати результати досліджень у цих двох групах обстежених?

2. У розділі 4 сказано: «Встановлено зниження відносного рівня лімфоцитів на стадії раннього апоптозу із фенотипом анексин V<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> у ПК працівників об'єкта «Укриття» та УЛНА на ЧАЕС III підгрупи ( $D > 500$  мЗв) порівняно із контролем» (стор. 106–107), тоді як у висновках до розділу (стор. 113) йдеться про те, що у віддаленому періоді після опромінення у дозах,

більших за 500 мЗв, процес не супроводжується підвищення кількості анексин V<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> лімфоцитів. То який з висновків є вірним?

3. На багатьох рисунках (наприклад, рис. 3.2 (стор. 86), 4.1 (стор. 103), 5.1 (стор. 119), 5.2 (стор. 120), 6.6 (стор. 144), 6.8 (стор. 149) та ін.) – відлік на осі ординат починається не з нульової позначки, що впливає на сприйняття результатів досліджень: різниця між групами обстеження видається більшою, ніж є насправді. Те ж стосується рисунків автореферату: рис. 3, 4, 6, 7, 8. На деяких рисунках відлік починається з відмінних значень, зокрема на рис. 7.1–7.16 (розділ 7), що демонструють експресію низки генів. Але ж експресія гена не може бути нижчою за нуль.

4. Кількість вказаних наукових праць за темою дисертації (74) не відповідає переліку робіт, що приведені у авторефераті (38 посилань). Також не зрозуміло, що означає: «розділів монографій – 7». Це 7 розділів однієї, двох і т. д., чи семи монографій?

5. У розділі «Практичне значення отриманих результатів» вказано лише три з чотирьох патентів, розроблених за участі автора. Викликає також запитання відповідність темі дисертації одного з патентів, а саме: «Спосіб ретроспективного диференційного визначення опромінення головного мозку людини, яке відбулося на етапах раннього періоду розвитку», оскільки дисертація присвячена дослідженню впливу опромінення на імунну систему, а не на головний мозок.

6. У розділі 8 «Аналіз і узагальнення результатів досліджень» автор дублює дані про вихідний матеріал та методи досліджень, які детально описані у розділі 2 «Матеріал та методи дослідження». Таке дублювання не є ні необхідним, ні раціональним. Також нераціональним є виділення у межах розділу 8 підрозділу 8.1, оскільки він лише один і інших підрозділів немає.

7. Невдалим є вислів «стабільні порушення в імунній системі» у розділі «Наукова новизна отриманих результатів» (стор. 12) та у висновку 2 (стор. 264), адже будь-які порушення є проявом нестабільності. Що мається на увазі: порушення, які постійно виникають, чи порушення, які стабільно успадковуються в ряду клітинних поколінь?

Зазначені зауваження не знижують загальної високої оцінки дисертаційної роботи. Вона є досить ґрунтовною і за важливістю досліджуваних питань, і за об'ємом експериментальних даних. Отримані результати представляють значний науковий інтерес і мають практичне значення.

**Висновок.** Дисертаційна робота І. М. Ільєнко «Генна регуляція апоптозу, проліферації та старіння імунокомпетентних клітин людини у ранньому та віддаленому періодах після опромінення» є завершеною науково-дослідною роботою, в якій представлено вирішення актуальної наукової проблеми у галузі радіобіології та генетики щодо з'ясування впливів зовнішнього опромінення у широкому діапазоні доз на генну регуляцію апоптозу, проліферації та старіння імунокомпетентних клітин на етапах реалізації посттранскрипційних ефектів та формування радіаційно-індукованої імунологічної недостатності. За обсягом досліджень, науковою

новизною, теоретичним і практичним значенням, обґрунтованістю висновків робота цілком відповідає вимогам ДАК Міністерства освіти і науки України до докторських дисертацій згідно з «Порядком присудження наукових ступенів і присвоєння вчених звань», а її автор – І. М. Ільєнко заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальностями 03.00.01 – радіобіологія та 03.00.15 – генетика (біологічні науки).

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник,  
провідний науковий співробітник  
відділу генетики НДІ біології,  
професор кафедри генетики і цитології  
Харківського національного  
університету імені В. Н. Каразіна  
Міністерства освіти і науки України



В. Ю. Страшнюк