

Отзыв официального оппонента о диссертационной работе
Юлии Вячеславовны Виноградовой на тему: «Исследование повреждения и
процессов восстановления сетчатки глаза мышей после облучения ускоренными
протонами и действия метилнитрозомочевины» по специальности 03.01.01 –
«Радиобиология»

Актуальность.

Развитие современных технологий от года к году увеличивают давление генотоксических факторов на организм человека. Использование радиоактивного излучения или мутагенов химической природы в медицине для диагностики и лечения различных заболеваний (кардиохирургия, онкология и др.), а также влияние радиации и в других областях человеческой деятельности, может приводить к значительным побочным эффектам. Основное внимание, при исследовании таких эффектов, уделялось тканям, состоящих из делящихся клеток, а вопрос о влиянии излучения на терминально-дифференцированные ткани до сих пор остается открытым.

В спектре патологий глаза дегенеративные заболевания сетчатки занимают около 20%, поэтому этиология и патогенез этих заболеваний является предметом интенсивных исследований во всем мире. Среди которых важное место занимают наследственные заболевания (аутосомно-доминантная оптическая нейропатия, нейропатия Либера, болезнь Штадгарта и др.), что указывает на важную роль повреждений генома в развитии патологии.

Потому и актуально исследование механизмов повреждения и восстановления структуры и функции сетчатки при действии ионизирующей радиации и химических мутагенов, предпринятое в диссертации Ю.В. Виноградовой.

Научная новизна. Сетчатка млекопитающих обладает высокой резистентностью - гибель ее при воздействии ионизирующей радиации наблюдают, начиная с доз больших 15 Гр. Ответа на вопрос - с чем же связана такая устойчивость, пока нет. Автор диссертации показал, что в ответ на возникшие под действием определенных доз радиации повреждения ДНК в сетчатке глаза возрастает экспрессия генострессовых белков ATM и P53, которые стимулируют репарацию ДНК, но еще не вызывают апоптоза поврежденных клеток.

Анализ зависимости ответа сетчатки от интенсивности воздействия, показал наличие у сетчатки глаза генотоксического порога в 15 Гр. При дозах излучения ниже 15 Гр происходит восстановление поврежденного генома, а также структуры и функциональной активности сетчатки глаза мышей. Превышение этого порога вызывает морфологическую деградацию и необратимую потерю функциональной активности органа.

Наличие порога при действии повреждающих агентов, обусловленного активацией систем репарации, позволило обнаружить адаптивный ответ сетчатки при генотоксическом воздействии. Предварительное воздействие нитрозометилмочевины или ионизирующей радиации в низких дозах увеличивало устойчивость сетчатки к повторному воздействию повреждающего фактора в дозах вызывающих обычно деградацию сетчатки. В диссертации показано, что увеличение устойчивости сетчатки связано с блокированием путей апоптоза в фоторецепторах и активации защитной реакции глиальных клеток Мюллера.

Практическая значимость данной работы не вызывает сомнений. Полученные в работе дозовые зависимости воздействия ионизирующей радиации и нитрозометилмочевины могут быть использованы для оптимизации радио- и химиотерапии опухолей головы, мозга, шеи и глаз (подбор дозы фракционированного воздействия, длительности интервалов между фракциями), а также послужить прогностическим состоянием здоровья человека при осуществлении длительных пилотируемых космических полетов вне магнитосферы Земли, авариях на атомных станциях и т.д.

Общая характеристика диссертационной работы. Диссертация построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, выводов, заключения и списка литературы. Работа изложена на 94 страницах машинописного текста, иллюстративный материал включает 32 рисунка и 6 таблиц. Список литературы содержит 95 наименования, из них 8 на русском и 87 на английском языках.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи работы, охарактеризованы научная новизна, а также практическая значимость полученных результатов.

В литературном обзоре автор рассматривает имеющиеся на данный момент времени сведения о влиянии ионизирующей радиации на сетчатку глаза. Рассмотрено влияние, как на функциональную активность сетчатки, так и ее морфологию. Описаны условия, при которых влияние ионизирующей радиации и химических генотоксикантов оказывается критическим для риска возникновения патологий сетчатки. Прежде всего, это радио- и химиотерапия, а также межпланетные космические перелеты. Особое внимание уделено механизмам действия генотоксикантов, использованных в качестве повреждающих факторов в данной работе. Таким образом, литературный обзор сообщает необходимый объем сведений, позволяющий читателю войти в исследуемую проблематику. Однако учитывая радиобиологическую направленность работы, было бы желательным более подробное описание молекулярно-биологических аспектов функционирования генома клеток сетчатки. В частности, пути передачи

про- и контра-апоптотических сигналов в фоторецепторных клетках. Поскольку в диссертации важное место занимают молекулярно-биологические методы.

В главе, посвященной материалам и методам исследования, приведено подробное описание радиобиологических, биофизических и цитологических методов, использованных в работе. Следует отметить комплексный подход, использованный в работе. Благодаря такому подходу диссертант получил достоверные сведения о воздействии генотоксических агентов (ионизирующей радиации и химического мутагена) на функциональном, морфологическом и молекулярном уровнях организации сетчатки. Такой комплексный подход оказался возможным лишь при применении самых современных методов с использованием современной аппаратуры. Хочу отметить адаптацию метода комет для исследования сетчатки. Обычно метод комет используется для изучения клеточных культур, клетки которых могут быть легко суспендированы. Диссертант разработал методику, которая позволила исследовать клетки такой сложной ткани, как сетчатка.

Раздел экспериментальных результатов состоит из четырех основных частей. В первой части исследовано влияние облучения сетчатки ускоренными протонами. Тотальное облучение животных в дозе 14 Гр, как и следовало ожидать, не приводило изменениям сетчатки глаза мышей ни на функциональном, ни на морфологическом уровне. Вместе с тем было обнаружено увеличение экспрессии генострессовых белков ATM и P53. Исследование методом комет показало, что возникающие однонитевые и двунитевые разрывы ДНК сетчатки глаза, возникшие под воздействием ускоренных протонов и γ -квантов, эффективно репарируются в течение 10-15 ч. Репарация разрывов сопровождалась снижением экспрессии генострессовых белков ATM и P53.

Облучение области головы в дозе 25 Гр вызывало снижение амплитуд *a*- и *b*-волн электроретинограммы. В течение 6 дней жизни животных наблюдали нарастающую во времени дегенерацию сетчатки глаза, что сопровождалось массовой гибелью фоторецепторных клеток, скорее всего, по механизму апоптоза.

Сравнивая реакцию клеток сетчатки на облучение в дозах 14 и 25 Гр, автор приходит к выводу, что устойчивость сетчатки к дозам меньшим или равным 14 Гр обусловлена процессами репарации, тогда как при более высоких дозах эта способность клетки исчерпывается и начинается клеточная гибель. А это, по мнению автора, свидетельствует о том, что у сетчатки существует дозовый порог, равный 15 Гр. Нисколько не возражая против этой идеи, хочу заметить, что сравнение всего двух точек 14 и 25 Гр не позволяет так точно определить пороговое значение.

В качестве ключевого звена повреждения сетчатки ионизирующей радиацией автор выделяет повреждение фоторецепторов. Однако данные электрофизиологии говорят, что наря-

ду с фоторецепторами, о повреждении которых говорит снижение амплитуды *a*-волны, точно также снижается и амплитуда *b*-волны, что указывает на повреждение слоя нервных клеток.

Во второй части результатов представлены данные о влиянии нитрозометилмочевины на сетчатку глаза мышей. Здесь был получен аналогичный результат – наличие порога в дозовой зависимости. Интересно, что в отличие от ионизирующей радиации при действии допороговой дозы нитрозометилмочевины порог автор наблюдал восстановление электрической активности сетчатки.

Анализируя результаты, автор приходит к выводу, что высокая способность к репарации может быть обусловлена условиями, в которых функционирует сетчатка, а именно, активная работа по восприятию света требует высоких энергозатрат, то есть активной работы митохондрий и интенсивного снабжения клетки кислородом. Однако, повышение концентрации кислорода в клетке повышает вероятность случайного одноэлектронного восстановления O_2 до супероксид анион радикала O_2^{*-} на ферментах-переносчиках электронов NADH-КоQ-редуктазе и КоQH₂-цитохром *c*-редуктазе. Это означает, что клетки сетчатки подвергаются постоянному воздействию активных форм кислорода. Поэтому в сетчатке должны существовать мощные системы защиты от окислительного повреждения, в частности, системы репарации ДНК.

В третьей части работы диссертант исследует такую возможность и показывает, что действительно в ДНК клеток фоторецепторов имеются окси-повреждения. Сравнение с другими тканями (лимфоциты, печень, мозг) показывает тесную связь количества повреждений ДНК со степенью оксигенации ткани.

В четвертой части изучен адаптивный ответ сетчатки глаза мышей на введение нитрозометилмочевины и облучение протонами. Оказалось, что воздействие этих факторов в подпороговых дозах обладает адаптивным эффектом на сетчатку. Авторы предлагают два возможных механизма адаптивного ответа это блокирование апоптоза и активация глиальных клеток Мюллера. Оба механизма предполагают репарацию клеток фоторецепторного слоя. Блокирование апоптоза сохраняет клетки от гибели, что, по всей видимости, дает им возможность, вероятно, после репарации пула поврежденных белков успешно выполнять свою функцию, а именно воспринимать и передавать световой сигнал. Роль же активации пролиферации клеток Мюллера не столь понятна. Диссертант ссылается на возможную роль клеток Мюллера как, своего рода, плюрипотентных клеток. То есть глиальные клетки Мюллера способны трансформироваться в фоторецепторы. Однако такой клетке нужно не только размножиться и трансформироваться, но и переместиться в слой фоторецепторов. Хватит ли на это 48 часов, срок, по прошествии которого, наблюдали адаптивный ответ? Мне кажется, что нет. Поэтому с моей точки зрения, активация пролиферации клеток Мюллера имеет какой-то

другой смысл. Например, клетки Мюллера обладают способностью поддерживать нормальное функционирование клеток нейронального слоя сетчатки и по этой причине увеличение их количества необходимо для преодоления последствий повреждения.

Выводы диссертации адекватны полученным результатам. В заключении хочу подчеркнуть, что факт радиационной устойчивости сетчатки известен давно, вклад диссертанта в этот вопрос заключается в раскрытии механизмов такой устойчивости.

Аннотация диссертации адекватно отражает содержание работы и позволяет ознакомиться с логикой исследования, результатами и выводами автора. Основные положения диссертации отражены в опубликованных автором печатных работах, в число которых входит необходимое количество статей в журналах из списка, рекомендуемого ВАК для публикации результатов диссертационных исследований. По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них 4 в журналах, рекомендованных ВАК, 9 тезисов докладов на Российских и международных конференциях, а также 3 публикации в различных журналах и сборниках. Выводы работы отражают собственные результаты исследований автора.

Однако к диссертации имеется ряд замечаний:

1. В целом, диссертация написана хорошим языком, однако, встречаются опечатки. Некоторые фразы неясны или просто ошибочны. Например, на стр. 11 утверждается, что "...зрительный процесс базируется на прямом воздействии сфокусированных световых лучей на высокочувствительные нейроны глаза".
2. Морфологическое описание сетчатки дано только для схематического рисунка, что для читателя не гистолога создает трудности в идентификации структур на реальной микрофотографии (Рис. 1).
3. Суспензия клеток сетчатки, используемая в исследовании, представляет собой смесь клеток сетчатки (фоторецепторы, нейроны и клетки пигментного эпителия). Однако отсутствуют данные о соотношении перечисленных клеток в образце. Поэтому непонятно почему автор делает выводы только касательно фоторецепторных клеток. Может быть, стоило выводы распространить и на другие клетки сетчатки?
4. В качестве количественной оценки электроретинограммы автор использует сумму a и b -волн для измерения эффекта воздействия генотоксических факторов. Такой выбор также требует разъяснения, поскольку активность фоторецепторов, с повреждением которых диссертант связывает основные патологические изменения, отражена только в a -волне, тогда как b -волна демонстрирует активность нейронального слоя сетчатки.
5. Результаты статистического анализа представлены не совсем корректно: а) данные представлены в виде средних с разбросом, однако не указано, что это за разбросы - стандартная ошибка или стандартное отклонение, в последнем случае должны быть представлен объем

выборки; б) представление данных в виде средних подразумевает, что они описываются нормальным распределением, однако результаты тестов на нормальность не представлены; в) данные по достоверности различия между экспериментальными группами приведены не для всех результатов; г) Для анализа данных демонстрирующих восстановление амплитуды электроретинограммы после воздействия (Рис. 22), а также адаптивных ответ (Рис. 25, 26) был использован метод попарных сравнений, однако попарное сравнение для числа экспериментальных групп больших двух требует применение поправки Бонферрони.

Однако перечисленные недостатки не умаляют полученные результаты и выводы, сформулированные диссертантом.

В заключение можно сказать, что в диссертационной работе Ю.В. Виноградовой проведен большой комплекс разносторонних исследований, основные результаты получены впервые, практическая ценность не вызывает сомнений. Диссертация представляет собой законченное научно-квалификационное исследование, отвечающее всем требованиям ВАК к кандидатским диссертациям, и соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года. Автореферат и публикации полностью отражают материалы работы, диссертационный материал неоднократно докладывался на ведущих российских и международных конференциях. Автор диссертации, Ю.В. Виноградова, безусловно, заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – «радиобиология».

01 сентября 2015

Доктор биологических наук



Константин Олегович Муранов

Ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химических основ биологической регуляции

Федеральное государственное бюджетное учреждение

науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля

Российской Академии наук

119334, Москва, ул. Косыгина д. 4,

Тел. (495) 9397441

e-mail: k.muranov@sky.chph.ras.ru



Согласие на оппонирование

Я, Муранов Константин Олегович, согласен быть официальным оппонентом Виноградовой Юлии Вячеславовны по кандидатской диссертации на тему «Исследование повреждения и процессов восстановления сетчатки глаза мышей после облучения ускоренными протонами и действия метилнитрозомочевины» по специальности 03.01.01 – «Радиобиология».

О себе сообщаю:

Ученая степень: доктор биологических наук

Шифр и наименование специальности: 03.01.02 – биофизика

Ученое звание: нет

Должность: ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химических основ регуляции биологических систем ИБХФ РАН

Место и адрес работы: Москва, 119991, ул. Косыгина, 4, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля Российской академии наук

Телефон, e-mail: +7(495)9397441; k.muranov@sky.chph.ras.ru

Адрес места жительства (регистрации): г. Москва ул. Большая тульская д.54, кв. 170

Паспорт: серия 4505 444224 выдан ОВД Донского р-на г. Москвы 09/04/2003

Дата рождения: 6 августа 1956

Страховое свидетельство государственного пенсионного страхования № 011-403-074-61
ИНН 772629215287

Перечень работ по специальности оппонируемой диссертации

1. Шеремет, Н. Л., и др. Экспериментальное исследование влияния различных повреждающих факторов на состояние хрусталика. Сообщение 1. Особенности биомикроскопических изменений хрусталика. Вестник офтальмологии 2012 . [1], 8-12
2. Муранов, К. О., и др. Экспериментальное исследование влияния различных повреждающих факторов на состояние хрусталика. Сообщение 2: Особенности морфологических изменений хрусталика. Вестник офтальмологии 2012, [1], 12-16
3. Курова, и др. Экспериментальное исследование влияния различных повреждающих факторов на состояние хрусталика. Сообщение 3: Изменения белкового состава хрусталика. Вестник офтальмологии 2012, [1], 16-19
4. Muranov, K.O., et al., Comparative Study on Aging, UV Treatment, and Radiation on Cataract Formation. Biophysys 2010, 55, 870-7.

Ведущий научный сотрудник,
доктор биологических наук



К.О. Муранов

