

УТВЕРЖДАЮ

ВРИО директора
ГНЦ РФ - Института медико-биологических
проблем РАН
д.м.н., проф., академик РАН



И.Б.Ушаков

« ___ » _____ 2015 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Виноградовой Юлии Вячеславовны

«Исследование повреждения и процессов восстановления сетчатки глаза мышей после облучения ускоренными протонами и действия метилнитрозомочевины», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – радиобиология

Актуальность темы диссертации. Сетчатка глаза состоит из терминально дифференцированных клеток. Этот орган функционирует в жестких условиях воздействия экзогенных и эндогенных факторов, таких как кислородный стресс, радиационное и химическое воздействие. В диссертационной работе рассмотрено влияние воздействия редкоионизирующего электромагнитного и плотноионизирующего корпускулярного излучений в высоких дозах, а также химического препарата метилнитрозомочевины (МНМ) на сетчатку глаза мышей. Эти виды воздействия имеют широкое терапевтическое применение при лечении онкологических заболеваний, где при радиотерапии накапливаются высокие дозы ионизирующего излучения, что может привести к постлучевым осложнениям. Таким образом, актуальность проведенного в работе исследования повреждения и процессов восстановления сетчатки глаза мышей после воздействия ионизирующего излучения и метилнитрозомочевины не вызывает сомнений.

Исследование повреждения и процессов восстановления сетчатки глаза мышей требует использования сложной комбинации экспериментальных подходов. В представленной диссертационной работе сетчатка глаза исследуется не только с морфологической точки зрения, но и представляются результаты по функциональной активности сетчатки глаза, что позволяет существенно расширить представление о возникающих повреждениях в сетчатке глаза.

Основное место в работе занимает исследование способности сетчатки к восстановлению от генотоксического стресса разной природы. Изучение этой способности является актуальной задачей не только для радиобиологического, но и для радиационно-медицинского сообщества, а также для военных и медицинских радиологов, практикующих в области лучевой терапии опухолей головы и шеи.

Достоверность и обоснованность результатов работы подтверждается строгой статистикой, хорошим согласием между результатами экспериментов, проведенных автором работы, в сравнении с данными, полученными другими авторами. В работе

использованы современные и традиционные методы экспериментального исследования и статистической обработки данных экспериментов.

Полученные соискателем результаты прошли апробацию и обсуждение на научных семинарах и международных конференциях.

Научная новизна. В диссертации впервые:

1. Исследована динамика формирования разрывов ДНК и их последующая репарация *in vivo* в сетчатке глаза мышей, облученных протонами высоких энергий и γ -квантами ^{60}Co . Показано, что в ответ на возникшие повреждения ДНК после облучения возрастает экспрессия генострессовых белков ATM и P53 в сетчатке глаза, которые стимулируют репарацию ДНК и не вызывают апоптоза поврежденных клеток.

2. Показана нелинейная зависимость ответа сетчатки на изученные воздействия, что говорит о наличии у сетчатки глаза генотоксического порога. Этот порог эквивалентен дозе облучения ускоренными протонами ~ 15 Гр, ниже которого происходит восстановление поврежденного генома, а также структурной целостности и функциональной активности сетчатки. При воздействии ускоренными протонами в дозе выше пороговой – 25 Гр или после введения МНМ в дозе 70 мг/кг в сетчатке наблюдались структурная деградация и необратимое снижение/утрата функциональной активности.

3. Показано, что предварительное введение мышам МНМ в нетоксической дозе повышает толерантность сетчатки глаза к последующему действию агента в ретинотоксической дозе. Такое фракционированное воздействие МНМ снижает экспрессию эффекторной апоптотической каспазы-3 и гибель фоторецепторных клеток по сравнению с однократным воздействием МНМ в ретинотоксической дозе.

4. Показано, что предварительное облучение протонами в дозе 1 Гр вызывает адаптирующий эффект зрелой сетчатки глаза: она приобретает устойчивость к последующему ретинотоксическому действию МНМ. Эффект радиационного гормезиса сетчатки согласуется с возрастанием эффективности репарации двунитевых разрывов ДНК.

5. Обнаружена активация глиальных клеток Мюллера (ГКМ) в сетчатке глаза в ответ на инъекцию мышам МНМ в дозе 70 мг/кг. Отмечается тенденция к снижению числа активированных ГКМ в сетчатке глаза после последовательного введения МНМ в дозе 17 и 70 мг/кг.

6. Показано наличие в сетчатке глаза спонтанных повреждений ДНК в виде щелочеллабильных сайтов, которые являются окси-модифицированными основаниями ДНК.

Практическое значение результатов работы. Результаты проведенного исследования имеют теоретическое и практическое значение для решения фундаментальной проблемы повреждения и восстановления терминально дифференцированных клеток сетчатки глаза. Результаты по восстановлению и гормезису сетчатки глаза могут быть использованы для оптимизации радио- и химиотерапии опухолей головы, мозга, шеи и глаз. Модель МНМ-индуцированной дегенерации сетчатки глаза может использоваться для первичной оценки эффективности лекарственных средств, препятствующих дегенерации сетчатки глаза, и для прогноза опасности ретинотоксического воздействия на человека радио- и химиотерапевтических процедур.

Полученные данные также могут послужить прогностическим показателем влияния условий космоса на человека при осуществлении длительных пилотируемых космических полетов.

Анализ основного содержания работы.

В **главе I** приведен обзор литературы, где дан убедительный анализ состояния проблемы на сегодняшний день с широким охватом научной литературы по радиационной биологии зрения и сетчатки глаза.

Глава II посвящена методической части работы, представляющей набор современных и традиционных методов исследования – визуально-микроскопических (морфологических), цитологических (иммуноцито- и гистохимия), биохимических (конвенциональный электрофорез и вестерн-блоттинг) и биофизических (комет-ассей, электроретинография) методов.

В **главе III** приведены экспериментальные данные диссертации. Здесь автор последовательно проанализировал начальное радиационное и химическое поражение сетчатки и последующую динамику ответа сетчатки глаза на возникшее повреждение. Весь дизайн эксперимента позволил продемонстрировать широкие экспериментальные возможности для анализа взаимосвязи структуры и функции сетчатки глаза в условиях мощных генотоксических воздействий. Другим важным результатом работы является обнаружение факта восстановления сетчатки глаза и стимуляции восстановления под действием субпороговых доз генотоксиканов. По сути, впервые на таком сложном объекте как сетчатка глаза сведены в единый комплекс показатели адаптивного ответа на радиационное и химическое воздействие на молекулярном (репарация ДНК), клеточном (экспрессия белков-маркеров и апоптоз), тканевом (иммуногистохимия) и функциональном (ЭРГ) уровнях. Степень подробности описания экспериментальных методов и результатов экспериментов не вызывает нареканий. Все полученные в главе III данные подробно обсуждены и обстоятельно сравнены с результатами других авторов в **главе IV**.

Глава IV посвящена обсуждению результатов исследования.

В целом, построение разделов диссертационной работы обладает внутренним единством и показывает завершённость проведённой исследовательской работы. Работа написана хорошим языком. Следует отметить наглядность и высокое качество иллюстраций.

Наряду с достоинствами, следует отметить некоторые недостатки диссертационной работы.

1) Не совсем корректно утверждение о том, что полученные данные могут быть использованы для прогноза радиационных повреждений при космических полетах. Примененные автором дозы облучения, особенно 25 Гр, слишком высоки и не могут быть получены в космическом полете.

2) Для практической значимости работы, как в плане оценки последствий радиационных факторов космического полета, так и для адронотерапии было бы перспективно использовать не только гамма-излучение и протоны, но и тяжелые ионы.

Высказанные замечания носят характер пожеланий для дальнейшего совершенствования результатов и поэтому не снижают общей положительной оценки работы.

Таким образом, диссертационная работа Ю.В. Виноградовой «Исследование повреждения и процессов восстановления сетчатки глаза мышей после облучения ускоренными протонами и действия метилнитрозомочевины» является законченной научно-исследовательской квалификационной работой высокого уровня, направленной на изучение непосредственных и ближайших молекулярных, морфологических и функциональных последствий воздействия редкоионизирующего электромагнитного (γ -кванты) и плотноионизирующего корпускулярного (ускоренные протоны) излучений в высоких дозах, а также химического препарата метилнитрозомочевины (МНМ) на сетчатку глаза мышей. Работа удовлетворяет всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Тема и содержание диссертации соответствуют специальности 03.01.01. – «радиобиология», а соискатель Виноградова Ю.В. заслуживает присуждения ей степени кандидата биологических наук по указанной специальности.

Диссертация и отзыв рассмотрены на заседании совместного семинара отдела экспериментальной биологии и медицины и отдела радиационной безопасности пилотируемых космических полетов ГНЦ РФ – Института медико-биологических проблем РАН 14 июля 2015 г., протокол заседания № 14/7 от 14.07.2015 г.

Зав. отделом экспериментальной биологии и медицины

ГНЦ РФ – ИМБП РАН, д.б.н.

А.С.Штемберг

«___» _____ 2015 г.

Наименование организации: ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем РАН

Должность: заведующий отделом

Почтовый адрес: 123007, Москва, Хорошевское шоссе, д. 76А

Домашний адрес: 117246, Москва, Севастопольский проспект, д. 44, к. 4, кв. 252

Моб. тел 8-916-751-17-62, e-mail andrei_shtemberg@mail.ru

Подпись д.б.н. Штемберга А.С. удостоверяю

Зав. научно-организационным отделом ГНЦ РФ – ИМБП РАН,

д.м.н., проф.



М.В.Поляков

Сведения об организации

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-
биологических проблем Российской академии наук,

ВРИО директора Ушаков Игорь Борисович, д.м.н., проф., академик РАН.

Адрес: 123007, Россия, г. Москва, Хорошевское шоссе, 76 А,

Тел. (499) 195-2363, (499) 195-1500, E-mail: info@imbp.ru

Ведущая организация подтверждает, что соискатель не является ее сотрудником и он не имеет научных работ по теме диссертации, подготовленных на базе ведущей организации или в соавторстве с ее сотрудниками.

Избранные работы сотрудников организации по теме, соответствующей данной диссертации:

1. Ушаков И.Б., Штемберг А.С. Радиационная физиология высшей нервной деятельности: итоги и перспективы. Российский физиологический журнал, 2010, Т. 96. № 7. С. 867-874.
2. Штемберг А.С. Особенности модифицирующего влияния факторов, формирующих исходное функциональное состояние центральной нервной системы, на динамику нарушений высшей нервной деятельности крыс, подвергнутых тотальному воздействию электронного и гамма-излучения в дозе 100 Гр. Радиационная биология. Радиозкология. 2011. Т. 51. № 2. С. 233-242.
3. Ушаков И.Б., Штемберг А.С. Резистентность организма к экстремальным факторам: физиологические основы, регуляция, прогнозирование. Успехи физиологических наук. 2011. Т. 42. № 3. С. 26-45.
4. Штемберг А.С., Базян А.С., Лебедева-Георгиевская К.Б., Матвеева М.И., Кудрин В.С., Кохан В.С. Влияние облучения протонами высокой энергии на поведение крыс и его нейрохимические механизмы. Авиакосм. и экол. медицина. 2013. Т. 47. № 6. С. 54-60.
5. Матвеева М.И., Штемберг А.С., Тимошенко Г.Н., Красавин Е.А., Наркевич В.Б., Клодт П.М., Кудрин В.С., Базян А.С. Влияние облучения ионами углерода ^{12}C на обмен моноаминов в некоторых структурах мозга крыс. Нейрохимия. 2013. Т. 30. № 4. С. 1-6.
6. Штемберг А.С., Базян А.С., Кохан В.С., Кудрин В.С., Матвеева М.И., Лебедева-Георгиевская К.Б., Тимошенко Г.Н., Молоканов А.Г., Красавин Е.А., Наркевич В.Б., Клодт П.М. Воздействие высокоэнергетических протонов в пике Брэгга на поведение крыс и обмен моноаминов в некоторых структурах мозга. Нейрохимия. 2015. Т. 32. № 1. С. 78-85.

ВРИО директора ГНЦ РФ - ИМБП РАН



И. Б. Ушаков