

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу

Е.И. Сарapultьцевой «Прямые и отдаленные эффекты радиационного облучения у простейших и ракообразных», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.01 – радиобиология

Проблема ревизии взглядов на механизмы развития постлучевых реакций у различных представителей биоты остается в центре внимания ученых и специалистов-радиобиологов. Это связано как с необходимостью лучшего понимания общих биологических закономерностей отклика живых организмов на действие ионизирующей радиации и других факторов, так и в целях получения адекватных результатов для оценки риска негативных воздействий различной этиологии и разработки способов снижения их последствий. В рамках классической концепции теоретической радиобиологии – теории мишеней – не всегда удается корректно прогнозировать динамику развития и исход поражения. Тем более, что в реально существующей природной среде проблема осложняется полифакторностью воздействия, развитием процессов аддитивности, антагонизма или синергизма, затрудняющих определение вклада каждого из агентов, «bystander effect». В то же время, спектр сопутствующих стресс-агентов, модифицирующих эффекты облучения, в современном техногенном мире постоянно расширяется.

Сформулированный в Публикациях МКРЗ в 70-90 годах 20 века антропоцентрический принцип, постулирующий соблюдение защиты биоты при условии гарантирования безопасности человека, в двухтысячных годах все больше подвергается критическому анализу. При этом акцент сдвигается в сторону эоцентрического принципа, который предполагает необходимость использования прямых доказательств о защищенности живых организмов. Одной из ключевых проблем является выбор референтных видов и критериев оценки их отклика на воздействие. Результаты количественных оценок ответных реакций на действие стрессоров служат основой определения риска возникновения неблагоприятия. Эта методология реализуется при разработке регламентирующих документов ВОЗ, МКРЗ, НАТО и др. В список референтных растений и животных внесено 12 представителей природных (наземных и водных) экосистем (в том числе, краб,

рыбы). Вместе с тем, для прогнозирования развития негативных последствий, особенно в биоценологическом аспекте, необходимо не только системное представление о механизмах воздействия на различные звенья метаболизма, но и передачу информации в поколениях.

Вообще, сочетание экспериментальных изысканий с их трактовкой на экологическом уровне крайне сложная задача, требующая широты взглядов и привлечения совершенно новых методологических подходов, повышающих уровень анализа информации. Впрочем, даже поэтапные достижения в какой-то из этих глобальных задач могут быть исключительно полезны для совершенствования контроля за объектами окружающей среды в целом.

Диссертационная работа Е.И. Сарапульцевой посвящена одному из направлений актуальной проблемы, связанной с изучением эффектов воздействия ионизирующих и неионизирующих излучений на живые организмы, использования результатов отклика в качестве оценки меры воздействия на биоту, а также в целях биологического мониторинга радиоактивного загрязнения гидросферы. Это делает работу актуальной и востребованной как радиэкологами, радиобиологами, так и другими специалистами.

Отличительной особенностью диссертационного исследования, определяющего его научную новизну, является использование единого методологического подхода для проведения экспериментов на живых организмах (одно- и многоклеточных) различных генераций. В качестве инструмента исследований использовано низкодозовое радиационное воздействие, которое позволяет выявить общебиологические закономерности реакции живых организмов разных систематических групп и разных уровней организации живой материи на стресс, а механизмы проявления воздействия излучений различных длин волн развивают представления о прямом действии, передачи информации в поколениях или последующей их элиминации. Важным научным результатом является, прежде всего, описанный автором нелинейный характер кривой «доза-эффект» по поведенческой активности *Spirostomum ambiguum* и формирование прямых и отдаленных последствий у инфузорий в электромагнитном поле. Результаты радиационно-индуцированных реакций у ракообразных так же приоритетны, поскольку, несмотря на достаточное количество литературных данных, ранее эти

объекты не рассматривались в качестве референтных с высокими возможностями биоиндикации, в том числе, для биологического мониторинга.

Практическая ценность работы заключается в широком использовании её результатов в образовательном процессе вузов, исследовательских работах, в комплексной оценке состояния окружающей среды и определении пределов адаптивной емкости экосистем.

Основные положения работы отражены в опубликованных по теме диссертации 116 работах (в том числе в журналах из перечня ВАК, международных изданиях, учебных пособиях), а также доложены на международных конференциях.

Диссертация изложена на 218 страницах, построена в классическом стиле и состоит из введения, глав обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы из 316 источников отечественных и зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована табличным материалом и рисунками.

В литературном обзоре представлен анализ спектра вопросов, характеризующих эффекты низкоинтенсивного ионизирующего и неионизирующего излучений на биоту. Подчеркнута значимость экоцентрического подхода в оценке действия излучений на живые организмы, необходимость расширения спектра референтных видов. Отмечено, что репродуктивный потенциал у рыб (а они включены в список референтных видов) имеет более высокую вариабельность на действие ионизирующих излучений и менее чувствителен, чем этот показатель у водных беспозвоночных.

Подробно описан жизненный цикл выбранных для исследований объектов, функциональные особенности, а так же ряд радиационно-индуцированных ответных реакций у ракообразных, простейших. Автор удачно оперирует к имеющейся международной базе данных FREDERICA, включающей свыше 3000 источников, и отмечает отсутствие показателей цитогенетических мутациях у ракообразных. При этом для референтного вида – краба – эти данные тоже отсутствуют, хотя в ряде публикаций по ракообразным они приводятся. В некоторых работах рассматриваются показатели жизнедеятельности ракообразных (плодовитость, выживаемость и др., поведенческий характер), зависимость от дозы

облучения. Обилие приведенных в литературном обзоре результатов, порой, не позволяет выделить основные характеристики, поэтому хорошим бы решением было табличное представление данных. Рассмотренные в разных главах литературного обзора данные служат диссертанту не только для выбора объектов исследования, но и определения наиболее чувствительных тест-систем.

Следует отметить высокий научно-методический уровень, комплексный подход и спектр выбранных методик, изложенных в главе материалы и методы. Использование МТТ-теста (который предложен и используется для оценки цитотоксичности потенциально противоопухолевых соединений) применительно к модельным объектам для биотестирования радиационных эффектов так же можно отнести к достижениям и активной позиции автора диссертационной работы.

Вообще диссертант - Е.И. Сарапульцева - взялась за дело, в какой-то степени, поиска универсального биоиндикатора на примере живых организмов разных групп (простейшие и ракообразные), для разных источников излучения (спектр ионизирующих и электромагнитных длин волн), что бесконечно трудно и вряд ли необходимо, но, с точки зрения выявления общебиологических закономерностей, имеет право на существование. Анализ и сопоставление результатов такого рода работ во многом зависит от тщательности дозиметрических измерений, особенно в области низкодозовых излучений или плотностей потока энергии. От этого колеблется диапазон величин показателей и их интерпретация, наличие порога и т. д. Конечно, эти результаты в дальнейшем должны стать основой базы данных, а наличие верифицированных физических параметров экспериментов позволит выявить сопряженные пары и даст возможность корректного сравнения результатов.

Результаты экспериментов, изложенные в диссертационной работе, подвергнуты статистическому анализу, корректно описаны и, как правило, представлены графически. В целом, их обсуждение и сделанные выводы соответствует выносимым на защиту положениям – их основному звучанию. Полученные данные так же согласуются с известным феноменом о наличии участков гиперчувствительности и индуцированной радиорезистентности. Это еще раз подчеркивает важность исследований радиобиологических эффектов малых доз и плотностей потока энергий, а не экстраполяции эффектов высоких дозовых и

электромагнитных нагрузок на этот диапазон излучений. Совокупность полученных в диссертационном исследовании данных, касающихся функционального состояния *S. ambiguum* и *D. magna* (включая морфологический и биохимический уровни), их выживаемости после воздействия факторов разной природы, закрепление эффектов в поколениях, использование широкого диапазона доз облучения (от 0,01 до 10 Гр) и плотности потока энергии (от 0,05 до 0,5 Вт/м² при разной частоте облучения 1-10 ГГц) является потенциально уникальной базой данных ответных реакций организмов на воздействие облучения.

Очень интересные результаты получены с использованием МТТ – теста на дафниях. Наглядно показано изменение активности митохондриальных дегидрогеназ в первом поколении *D. magna* при облучении родительского поколения в дозе 10000 мГр и восстановлении активности фермента во втором поколении, что хорошо согласуется с показателями выживаемости и общей плодовитости рачков. Вместе с тем, возникает вопрос, почему при отсутствии существенных различий в выживаемости и общей плодовитости в F₁ при облучении F₀ в дозах 1000 и 10000 мГр (рис. 5 автореф.) активность дегидрогеназ отличается на порядок (табл. 4 и 6 автореф.). Возможно, это обусловлено формированием радиочувствительных особей в F₁, снижением численности выборки (табл. 22 дис.) и др., и почему эффект элиминируется в F₂.

При выборе спектра показателей диссертант очень правильно обращает внимание на вариабельность их значений в зависимости от дозы или плотности потока энергии излучения. В этой связи для представления полной картины развития ответных реакций после воздействия факторов разной природы важное значение имеет совокупность данных. Однако в работе часто «линейка» доз при исследовании одного показателя отличается от используемой при изучении другого параметра, что не дает возможности представления общей ситуации или даже может приводить к искаженному её пониманию. Так, если сравнивать выживаемость дафний в F₁ при облучении F₀ в дозах 100 и 1000 мГр и митохондриальную активность дегидрогеназ – то эти показатели не имеют значимых отличий, тогда как по уровню свободных радикалов (стр. 33 дис.) отмечена аномальное повышение их уровня в группе особей, облученных в дозе 100 мГр и совсем иной характер при облучении в дозе 1000 мГр. Интересно было

бы сравнить эти данные с показателями для группы дафний, облученных в дозе 10000 мГр, но такие результаты отсутствуют. Принимая во внимание чувствительность показателя концентрации свободных радикалов к действию облучения, возникает необходимость в объяснении наблюдаемого феномена и дополнительных экспериментальных доказательств.

Большим преимуществом диссертационной работы, с моей точки зрения, является то, что автор не «отмахивается» от «неудобных» результатов, а пытается в какой-то степени их объяснить. Это относится, и в том числе, к полученной автором зависимости двигательной активности *S. ambigua* от дозы облучения в электромагнитном поле на частоте 1 ГГц при разных потоках энергии (0,05; 0,1 и 0,5 Вт/м²). При этом с увеличением частоты электромагнитного поля до 10 ГГц при плотности потока 0,1 Вт/м² так же наблюдается отсутствие дозовой зависимости, точнее, например, некий «провал» величины показателя двигательной активности при облучении исходной выборки в дозе 1440 Дж/м², и близкий характер ответных реакций при дозах 360 и 2160 Дж/м², что нуждается в объяснении. Можно допустить, что эти явления по сути своей отражение феномена гиперчувствительности, но наблюдаемая смена поколений в течение 30 суток заставляет задуматься о гетерогенности популяции или необходимости более четкого разделение особей в поколениях, что влечет неизбежно методические сложности. Еще возникают вопросы, связанные с обеспечением дозиметрических измерений и гомогенности излучений в разных диапазонах доз и плотностей потока энергии, хотя этим вопросам автор и уделяет внимание в главе 4 - материалы и методы (кстати, нигде не обсуждается возможные изменения величины показателей в зависимости от мощности дозы облучения, которая колебалась от 2,8 до 100 сГр/мин).

Высокий интерес к представленному многочисленному экспериментальному материалу обуславливает возникающие в ходе обсуждения результатов диссертации вопросы и еще в большей мере подчеркивает сложность популяционных исследований и интерпретацию данных.

Диссертант ставит перед собой задачу «Разработать принципы построения биологического мониторинга действия на гидробионтов радиационного фактора на основе анализа прямых и отдаленных эффектов у простейших *S. ambigua* и

ракообразных *D. magna* при надфоновых уровнях облучения” при этом ни в диссертации, ни в автореферате этому вопросу не посвящается раздел для самостоятельного обсуждения. Рассмотренные в гл. 2 литературном обзора посылки к проведению исследований (“Место биотестирования в системе радиационного мониторинга водной среды”) далее в работе не развивают принципы, критерии биомониторинга, а лишь констатируют возможности применения в целях биомониторинга при обсуждении конкретных результатов. Хотя в представленных к диссертационному исследованию работах и учебном пособии этому направлению придается самостоятельное звучание.

Работа достаточно хорошо оформлена, написана понятным языком, хотя и встречаются стилистически не выверенные выражения, например «...остро облучали...», «эффекты... были сопоставимы с возможными механизмами...» и другие неточности и ошибки.

Автореферат отражает суть работы, ее объем и основные результаты, хотя и отличается и по построению, и по представлению результатов от диссертации.

Высказанные в ходе обсуждения диссертационной работы замечания не снижают ценности разработанного автором направления исследований в радиобиологии и значимости полученных результатов. Полагаю, что они могут стать элементом критического анализа для дальнейшего совершенствования разработок, в том числе с точки зрения их реального практического применения.

Заключение. Таким образом, диссертационная работа Елены Игоревны Сарапульцевой «Прямые и отдаленные эффекты радиационного облучения у простейших и ракообразных» является законченным научно-квалификационным исследованием, расширяющим научное представление о радиобиологических аспектах действия ионизирующих и неионизирующих излучений на представителей разных систематических групп. В ней представлен методологический подход и методическое решение изучения прямых и отдаленных (до 5 поколений) биологических эффектов малых доз радиации и электромагнитных излучений разных длин волн; расширены общебиологические представления о специфике развития ответных реакций в зависимости от силы и мощности воздействия и закреплении эффекта в поколении, выбора критериев оценки отклика; определена возможность использования разных тест-систем для

биологического мониторинга. Полученные в результате исследований данные нашли реализацию в исследовательской и образовательной практиках и могут быть использованы для мониторинга состояния объектов окружающей среды после воздействия излучений разных длин волн.

Работа соответствует критериям, установленным пунктами 9 и 10 «Положения о присуждении учёных степеней» (с изменениями и дополнениями), утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор, Е.И. Сарапульцева, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.01. – радиобиология.

Доктор биологических наук, профессор,
ведущий научный сотрудник
лаборатории радиопатологии
Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба –
филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический
центр» Минздрава России, Обнинск

Л.Н. Ульяненко

Подпись Л.Н. Ульяненко удостоверяю
Ученый секретарь Ученого совета
МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиала «НМИРЦ»
Минздрава России, кандидат биологических наук



Н.А. Печенина

Зам. председателя
диссертационного совета Д 501.001.65
д. физ.-мат. наук,
профессору А. П. Черняеву
д. б. н., профессора Л. Н. Ульяенко

ЗАЯВЛЕНИЕ

Я, Ульяенко Лилия Николаевна, доктор биологических наук по специальности 03.01.01- радиобиология, профессор по специальности 03.01.01- радиобиология, ведущий научный сотрудник Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба - филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации (МРНЦ им. А.Ф. Цыба - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России), согласна быть оппонентом Сарапульцевой Елены Игоревны по диссертации на тему «Прямые и отдаленные эффекты радиационного облучения у простейших и ракообразных», представленной на соискание учебной степени доктора биологических наук по специальности 03.01.01 – радиобиология.

Последние публикации по теме:

1. Ульяенко Л.Н., Удалова А.А. Оценка состояния окружающей среды по реакции сельскохозяйственных растений на действие ионизирующих излучений // Радиация и риск. Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра. 2015. Т. № 1. С. 118-131.
2. Oudalova A.A. Oulianenko L.N., Geras'kin S.A. Development of an approach to assess critical doses and dose rates for cultivated plants // Radioprotection. 2011. V. 46. N 6. S. 249–254.
3. Удалова А.А., Алексахин Р.М., С.А. Гераськин, Ульяенко Л.Н., Филипас А.С. Методология оценки допустимого воздействия ионизирующих излучений на агроценозы // Радиационная биология. Радиозкология. 2010. Т. 50. № 5. С. 1-10.

Координаты для связи:
Россия, 249036, Калужская область, г. Обнинск, ул. Королева, 4.
Телефон/факс: (484) 39 97276
e-mail: oulianenکو@yandex.ru

Д.б.н., профессор

Л.Н. Ульяенко

Подпись доктора биологических наук,
профессора Ульяенко Л.Н. удостоверяю

Зам. директора по научной работе
МРНЦ им. А.Ф. Цыба
- филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России



Л.П. Жаворонков

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию
Сарапульцевой Елены Игоревны на тему "Прямые и отдаленные эффекты
радиационного облучения у простейших и ракообразных", представленную на
соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 03.01.01 – радиобиология**

Актуальность избранной темы.

Для радиационной биологии, радиоэкологии, электромагнитной биологии и биофизики все более актуальными становятся проблемы исследования механизмов биологического действия ионизирующих и неионизирующих электромагнитных излучений (ЭМИ), а также вопросы защиты живых систем от техногенного загрязнения окружающей среды. Учитывая расширяющееся применение ионизирующих излучений в медицине в диагностических и терапевтических целях, а также в связи с сохраняющейся опасностью поражения при возникновении внештатных ситуаций на объектах атомной промышленности, с захоронением радиоактивных отходов, увеличивается вероятность случаев контакта людей и животных с ионизирующей радиацией. Развитие телекоммуникационных технологий, средств связи, радиолокации и радионавигации влечет за собой освоение новых диапазонов частот радиочастотных ЭМИ, увеличение мощности и площади покрытия радиопередающих систем, усложнение структуры электромагнитных сигналов. Все это приводит к очевидному вопросу о потенциальных неблагоприятных воздействиях техногенных ионизирующих и неионизирующих ЭМИ, а следовательно, к необходимости оценки прямых и отдаленных эффектов. В связи с этим диссертационная работа Сарапульцевой Е.И., посвященная анализу прямых и отдаленных последствий биологического действия ионизирующего и радиочастотного излучений, в том числе в малых дозах и низких интенсивностях, несомненно, является актуальной.

В настоящее время крайне актуальной является проблема разработки единых и сопоставимых критериев для сравнительных исследований в целях биологического мониторинга радиоактивного загрязнения гидросферы. В представленной диссертационной работе предложена разработка принципов построения биомониторинга на простейших *Spirostomum ambiguum* и ракообразных *Daphnia magna* для детального анализа последствий радиоактивного загрязнения окружающей среды. Акцент сделан на приоритетность научных исследований на ракообразных, группе организмов, которые определены в качестве ключевой модели для разработки экологических основ радиационной защиты окружающей среды при различных сценариях радиационного воздействия.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Широкие знания диссертанта в ряде смежных областей – физиологии и зоологии простейших и ракообразных, биологическом мониторинге радиационного и химического загрязнения окружающей среды и других междисциплинарных отраслей позволили сформулировать новые выводы, положения и понятия относительно прямых и отдаленных радиационных эффектов у простейших и ракообразных; осуществить всесторонний анализ и выявить закономерности радиационно-индуцированных изменений целого ряда морфо-физиологических (выживаемость, плодовитость, продолжительность жизни, двигательная

активность и др.) и молекулярно-биохимических (метаболическая активность, свободно-радикальные реакции и метилирование ДНК) показателей у простейших и ракообразных при облучении в малых и средних дозах; обосновать возможность использования ракообразных *D. magna* в качестве референтного вида биологического мониторинга радиоактивного загрязнения пресноводных экосистем. Импонирует прагматическая точка зрения диссертанта о том, что при отсутствии повторного облучения ракообразных в надфоновых дозах произойдет восстановление жизнеспособности популяции во втором пострадиационном поколении.

Совершенно обосновано стремление диссертанта на основе полученного ею большого фактического материала показать возможность использования ракообразных *D. magna* в качестве референтного вида в биологическом мониторинге радиоактивного загрязнения пресноводных экосистем. Диссертант указывает при этом на специфику развития практики проведения мониторинга, в основу которой предлагает положить анализ не только прямых, но и отдаленных радиационно-индуцированных эффектов в нескольких поколениях ракообразных.

В диссертационном исследовании, осуществляя анализ эффектов у простейших и ракообразных, автор пришла к выводу, что прямые и отдаленные биологические эффекты от разных источников ионизирующего и неионизирующего излучения у инфузорий *S. ambiguum* и ракообразных *D. magna* имеют нелинейную зависимость от дозы с порогом и выходом на плато в области низких и средних доз и сохраняются в ряду пострадиационных поколений. Сопоставимые эффекты описаны разными авторами у некоторых видов простейших, ракообразных и других представителей беспозвоночных животных, что позволяет не сомневаться в достоверности полученных диссертантом результатов.

Обоснованности результатов исследовательской работы Сарапульцевой Е.И. способствовали правильно выбранный теоретический и эмпирический материал, верные методологические подходы, комплексный и системный анализ исследуемой проблемы, корректные, репрезентативные данные исследований, фактического и статистического материала, а также использование широкого круга российских и зарубежных научных источников литературы. Список литературы содержит 316 наименований, среди которых в достаточном количестве представлена литература последних лет.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Многие из представленных в работе результатов получены впервые, поэтому отмечу, на мой взгляд, основные. Впервые проведен всесторонний анализ прямых и отдаленных (в нескольких пострадиационных поколениях) радиационных эффектов у представителей двух филогенетических групп низших гидробионтов и выявлены диапазоны доз острого γ -облучения, вызывающие изменение продолжительности жизни и плодовитости у непосредственно облученных инфузорий и ракообразных и их потомства в ряду вегетативных и партеногенетических поколений. Впервые описан нелинейный характер зависимости "доза–эффект" по изменению поведенческой активности простейших *S. ambiguum* при радиационном воздействии. Впервые разработана система построения биологического мониторинга для оценки радиационных эффектов острого облучения на простейших и ракообразных. Достоверность полученных результатов и выводов не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Сарапульцевой Елены Игоревны является целостным, самостоятельным научным исследованием, отличающимся своей новизной. Диссертация представляет определенный интерес не только для научного сообщества, но и для практической деятельности в области радиационной защиты окружающей среды, так как в её основу положены результаты оригинальных концепций автора, отражающие актуальные вопросы теории и практики радиационных исследований на простейших и ракообразных представителях биоты.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов.

Изучение радиационно-индуцированных биологических эффектов по экологически важным популяционным показателям – выживаемости, продолжительности жизни и плодовитости ракообразных *D. magna*, позволили обнаружить диапазон доз, при которых происходит снижение этих параметров в облученном поколении. Обнаружено, что эффект сохраняется в первом необлученном поколении и исчезает во втором пострадиационном поколении *D. magna*. Эффект по выживаемости сопоставим с данными по радиационно-индуцированному нарушению плодовитости ракообразных и с имеющимися в литературе сведениями о значительно более сильном влиянии γ -облучения на плодовитость, чем на выживаемость у разных представителей биоты в хронических опытах. Представленный в диссертации материал является одним из первых системных исследований, в котором проанализированы отдаленные последствия облучения на плодовитость беспозвоночных животных в ряду пострадиационных поколений.

В работе показаны противоречия современного этапа формирования и развития научных взглядов на радиационные эффекты неионизирующего излучения. Автором проведен тщательный анализ долгосрочных изменений у представителей простейших – инфузорий *S. ambiguum* важных жизненных показателей (выживаемости и двигательной активности) в условиях низкоинтенсивного радиочастотного воздействия. Показана возможность сохранения радиационно-индуцированных эффектов в нескольких поколениях простейших. Примененный автором количественный метод "открытого поля", модифицированный для исследования изменения двигательной активности у *S. ambiguum*, позволил обнаружить эффекты облучения в дозах от 100 мГр. Нарушение двигательной активности коррелировало с морфометрическими изменениями, которые были зафиксированы методом прижизненной компьютерной морфометрии. Важно, что автор увидела и показала перспективы практического применения и потенциального развития методологии с использованием простейших для ранней диагностики радиационного воздействия на организм.

Принимая во внимание сведения из литературы и полученные в диссертации результаты экспериментальных исследований, можно согласиться с автором, что методологию биологического мониторинга с использованием *S. ambiguum* и *D. magna* можно унифицировать для оценки радиационных эффектов у низших гидробионтов и обеспечения более детального анализа последствий радиационного загрязнения окружающей среды.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.

Проведенный анализ прямых и отдаленных радиационно-индуцированных эффектов изменения выживаемости, продолжительности жизни и плодовитости у ракообразных *D. magna* может быть использован для целей биологического мониторинга радиационного

воздействия на гидробионтов. Результаты исследования могут быть включены в существующие базы данных (FREDERICA и др.), для обоснования величины приемлемого риска радиационного воздействия на гидросферу.

Обнаруженные в экспериментах с использованием инфузорий и дафний в качестве модельных тест-объектов закономерности радиационно-индуцированных эффектов станут значимым практическим приложением к решению задач радиационной защиты биоты.

Использование в целях биомониторинга низших гидробионтов значительно сократит количество экспериментов с млекопитающими и облегчит этические, моральные и экономические трудности, которые существуют в области радиационной защиты.

Материалы диссертации включены в учебник "Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование", получивший рекомендательный Гриф Министерства образования и науки РФ в качестве учебного пособия для студентов вузов, и могут быть использованы в учебном процессе подготовки научных кадров всех уровней высшего профессионального образования.

Оценить содержание диссертации, ее завершенность.

Автором проведен тщательный анализ литературы по известным радиационным эффектам у простейших и ракообразных. Данные литературы касаются особенностей строения, размножения и функционирования ветвистоусых рачков *Daphnia magna* и инфузорий *Spirostomum ambiguum*, которые используют в экотоксикологии, радиобиологии и радиоэкологии. В обзоре литературы проанализированы радиационно-индуцированные мутации, эффекты изменения плодовитости, выживаемости, процессов роста, дыхания, морфологических показателей и поведения у ракообразных. Поскольку изменение поведенческой реакции является эволюционно-обусловленным показателем физиологического состояния животных и одним из диагностических показателей стресса, то проанализировано также изменение выживаемости и поведения у простейших. Обзор литературы выполнен грамотно с объективной критической научной оценкой имеющихся данных по проблематике исследования.

Структура и логика изложения материала в диссертационном исследовании достаточно обоснованы в контексте раскрытия поставленной цели и задач исследования. Цели и задачи исследования, сформулированные автором, вполне достигнуты. Работа написана логично, доказательно, ясным и грамотным научным языком. Стиль и оформление работы не вызывают нареканий. Автором проведен анализ больших выборок, характеристики которых изучались на протяжении длительного периода после облучения. Сильную сторону диссертации составляет тщательно проведенный статистический анализ полученных результатов, что является немаловажным при изучении низких уровней воздействия по используемым в диссертации биологическим критериям.

Среди выводов диссертанта наиболее значимым представляется положение о том, что у ракообразных *Daphnia magna* снижение продолжительности жизни происходит после γ -облучения в дозах от 100 мГр. Эффект сохраняется у потомства в необлученном поколении и нивелируется во втором пострадиационном поколении. Снижение выживаемости коррелирует со снижением плодовитости и связано с нарушением активности митохондриальных дегидрогеназ, обусловленным повышением в 1.5–3 раза уровня свободных радикалов. Показано, что снижение плодовитости происходит при более низких дозах (от 10 мГр). Так как долгосрочное выживание видов сильно зависит от

индивидуальной плодовитости и выживаемости их потомства, изменения в репродуктивном процессе необходимо рассматривать как один из наиболее значимых сублетальных последствий загрязнения окружающей среды. Данный вывод, сделанный диссертантом на основе эмпирических наблюдений, подчеркивает биологическую значимость радиационных воздействий в низких и средних дозах как фактора окружающей среды, требующего контроля в рамках экологического мониторинга.

По теме диссертации опубликовано значительное число работ, в том числе 8 статей в международных и российских изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, 27 статей в российских журналах, рекомендованных ВАК. Результаты широко представлены на международных конференциях и конгрессах. Публикации и автореферат полно и всесторонне отражают авторскую концепцию и основные результаты работы.

Отметить достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, высказать мнение о научной работе соискателя в целом.

Диссертация и автореферат Сарапульцевой Елены Игоревны на тему "Прямые и отдаленные эффекты радиационного облучения у простейших и ракообразных" представляют теоретическую и практическую ценность, а автор показала себя профессионально состоявшимся научным исследователем. Диссертационная работа носит теоретический и прикладной характер, является оригинальным, самостоятельным исследованием, вносящим существенный вклад в решение проблемы оценки радиационных эффектов у разных представителей биоты и разработку новых подходов к защите и смягчению возможных последствий радиоактивного загрязнения окружающей среды.

К замечаниям и вопросам по диссертационной работе можно отнести следующее.

1. Поскольку одним из основных достижений работы является обоснование разработки принципов построения биомониторинга на простейших и ракообразных, следовало бы уделить больше внимания практическому применению предложенной методологии в натуральных экспериментах для ответа на вопросы об использовании физиолого-биохимических показателей на модельных объектах (инфузориях и ракообразных) в природных экосистемах.
2. Для понимания закономерностей формирования биологических эффектов низкоинтенсивных радиочастотных ЭМИ безусловно необходимы эксперименты в контролируемых лабораторных условиях, но, учитывая сильное поглощение радиочастотных ЭМИ водой, реально действующие на гидробионтов мощности и дозы будут существенно ниже, при которых, возможно, биологические эффекты будут несущественны.
3. В таблице 3 указано, что расстояние между антеннами и облучаемым образцом составляло 25 и 5 см для частот 10 и 1 ГГц соответственно. Но в тексте раздела 4.2.3 читаем, что расстояние между антенной и образцом при частоте излучения 10 ГГц составляло 10 см, а при облучении с частотой 1 ГГц расстояние менялось и составляло 3,5, 18 и 30 см для создания соответствующей плотности потока энергии. Какие данные верны?
4. В таблице 10 достоверные отличия опыта и контроля отмечены с ошибками.
5. При статистическом анализе радиационно-индуцированных эффектов на выживаемость и плодовитость дафний более корректно было бы использовать примерно равные по размеру выборки, однако была использована объединенная

контрольная выборка, превышающая опытные в 2.5-4.5 раза, что естественным образом улучшает статистические различия.

6. Отдельный интерес представляет анализ эффектов радиочастотных ЭМИ на уровне многоклеточного организма, в данном случае ракообразных, но эти исследования либо не были проведены автором, либо не вошли в настоящую диссертацию.

Отмеченные недостатки не влияют на главные результаты и не снижают научной ценности диссертационной работы Сарапульцевой Е.И.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней.

Диссертационная работа Сарапульцевой Елены Игоревны "Прямые и отдаленные эффекты радиационного облучения у простейших и ракообразных" является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором на основании полученных автором результатов разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, имеющее существенное значения для дальнейшего развития фундаментальных и прикладных исследований по радиационной биологии, что соответствует требованиям п. 9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.01 - радиобиология.

Официальный оппонент,
д.ф.-м.н., профессор, главный научный сотрудник
лаборатории биологических эффектов неионизирующих излучений
ФГБУН Института биофизики клетки РАН

Гапеев А.Б.

Гапеев Андрей Брониславович
Шифр специальности: 03.01.02 - биофизика
Тел.: +7 (965) 440-57-32
e-mail: a_b_g@mail.ru
Россия, 142290, г. Пущино Московской области,
ул. Институтская, д.3, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
биофизики клетки РАН
Телефон/факс: (4967) 73-05-19 / (4967) 33-05-09



Подпись
Гапеев А.Б.
Удостоверяю *gab. kmh.*

Гр - 04.03.16

Зам. председателя
диссертационного совета Д 501.001.65
д. физ.-мат. наук,
профессору Черняеву А. П.
от д. физ.-мат. н., профессора Гапеева А.Б.

ЗАЯВЛЕНИЕ

Я, Гапеев Андрей Брониславович, доктор физико-математических наук по специальности 03.01.02 – биофизика, профессор по специальности 03.01.02 – биофизика, главный научный сотрудник лаборатории биологических эффектов неионизирующих излучений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биофизики клетки РАН (ИБК РАН), согласен быть оппонентом Сарапульцевой Елены Игоревны по диссертации на тему «Прямые и отдаленные эффекты радиационного облучения у простейших и ракообразных», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.01 – радиобиология.

Последние публикации по теме:

1. Гапеев А.Б., Лукьянова Н.А. Импульсно-модулированное электромагнитное излучение крайне высоких частот защищает ДНК клеток от повреждающего действия физико-химических факторов *in vitro*. Биофизика, 2015, т. 60, вып. 5, с. 889-897.
2. Gapeyev A.B., Aripovsky A.V., Kulagina T.P. Modifying effects of low-intensity extremely high-frequency electromagnetic radiation on content and composition of fatty acids in thymus of mice exposed to X-rays. *Int. J. Rad. Biol.*, 2015, Vol. 91(3), pp. 277-285.
3. Gapeyev A.B. Extremely high-frequency electromagnetic fields in immune and anti-inflammatory response. *In: Electromagnetic Fields in Biology and Medicine* (M.S. Markov ed.), Chapter 9, pp.129-152. – N.-Y.: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2015.

Координаты для связи:

Адрес: Россия, 142290, г. Пущино Московской области, ул. Институтская, д.3.
Телефон/факс: (4967) 73-94-12 / (4967) 33-05-09
e-mail: a_b_g@mail.ru

д.ф.-м.н., профессор

А.Б. Гапеев



О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Е.И. Сарапутьцевой «ПРЯМЫЕ И ОТДАЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ РАДИАЦИОННОГО ОБЛУЧЕНИЯ У ПРОСТЕЙШИХ И РАКООБРАЗНЫХ», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности «03.01.01 – Радиобиология».

Влияние человека на окружающую среду – неизбежный результат его жизнедеятельности, как одного из элементов биосферы. Преследуя цель создать для своего существования более благоприятные условия жизни, человечество сознательно и целенаправленно изменяет среду своего обитания. По мере развития цивилизации её влияние на природу постоянно усиливается. Продолжающийся рост численности населения на планете и его постоянно возрастающие потребности требуют вовлечения в эксплуатацию все новых и новых минерально-энергетических сырьевых ресурсов, создания и активного использования новых химических соединений, материалов и технологий.

Среди достижений последних 50 лет – бурное развитие и возрастающее использование ядерных технологий в военной отрасли, энергетике и медицине, а также беспроводных технологий радиосвязи (мобильная сотовая связь, WiFi, GPS и проч.), обуславливающих усиление радиационного загрязнения окружающей среды ионизирующим излучением и радиоволнами низкой интенсивности. Необходимость нормирования и контроля данного типа физических воздействий требует всесторонней оценки их влияния не только на человека, но и на другие виды живых организмов, включая и водные.

Действие ионизирующего излучения достаточно хорошо изучено для наземных организмов, заметно меньше исследованы в этом плане водная биота и еще меньше известно о влиянии на нее неионизирующего излучения, и в частности электромагнитного низкой интенсивности. Простейшие и водные беспозвоночные успешно и достаточно давно используются в качестве модельных тест-объектов при оценке действия химических веществ на живые системы. Особый интерес в силу биологических особенностей и жизненных циклов эти организмы представляют для оценки отдаленных и наследственных последствий действия неблагоприятных факторов различной природы.

Исходя из выше изложенного, становится очевидной актуальность представляемой к защите диссертационной работы Е.И. Сарапутьцевой «Прямые и отдаленные эффекты радиационного облучения у простейших и ракообразных», цель которой – оценить радиационные эффекты ионизирующего и неионизирующего излучения на субклеточном и организменном уровнях у облученных инфузорий *Spirostomum ambiguum* и ракообразных *Daphnia magna* и их потомства в нескольких пострadiационных поколениях и разработать на этой основе принципы биологического мониторинга радиоактивного загрязнения гидросферы».

Для достижения поставленной цели диссертантом решались следующие задачи:

1. Установить закономерности формирования прямых радиационно-индуцированных биологических эффектов от источников ионизирующего излучения в широком диапазоне доз у простейших *Spirostomum ambiguum* и ракообразных *Daphnia magna* по изменению показателей выживаемости, продолжительности жизни и плодовитости и оценить возможность использования этих тест-организмов и тест-функций в качестве модели для радиационных исследований.

2. Установить закономерности формирования отдаленных радиационно-индуцированных биологических эффектов от источников ионизирующего излучения в широком диапазоне доз в нескольких пострадиационных поколениях у простейших *S. ambiguum* и ракообразных *D. magna* при вегетативном и партеногенетическом размножении.

3. Выявить закономерности формирования прямых и отдаленных биологических эффектов от разных источников ионизирующего и неионизирующего излучения у *S. ambiguum* по морфофункциональным критериям (поведенческая активность и морфология) и оценить возможность использования этих тест-функций в качестве показателей радиационного стресса.

4. Проанализировать биохимические радиационно-индуцированные эффекты: вклад свободнорадикальных реакций в формирование прямых и отдаленных эффектов облучения, изменение метаболической активности и эпигенетические нарушения у *D. magna* в нескольких поколениях.

5. Разработать принципы построения биологического мониторинга действия на гидробионтов радиационного фактора на основе анализа прямых и отдаленных эффектов у простейших *S. ambiguum* и ракообразных *D. magna* при надфоновых уровнях облучения.

Структура работы традиционна для подобного рода исследований. Она состоит из списка условных обозначений, введения, трех глав обзора литературы, материалов и методов, результатов экспериментов, заключения, выводов, списка использованной литературы, который включает 316 источников, из них 229 на иностранном языке. Работа изложена на 218 с., содержит 33 рисунка и 23 таблицы.

Во Введении автор лаконично, но убедительно обосновывает актуальность избранной темы, формулирует цель и задачи исследования, научную новизну и практическую значимость, выносимые на защиту положения, указывает, где и когда проводилась апробация материалов, очерчивает личный вклад в работу, приводит количество публикаций по теме диссертации, описывает её структуру и объем, перечисляет основные источники финансирования, выражает благодарности коллегам, помогавшим в выполнении работы.

Обзор литературы представлен тремя главами (61 стр.). В главе «1. Биологические эффекты радиационного и химического загрязнения водной среды у низших гидробионтов» рассматривается действие физических и химических факторов на простейших и ракообразных,

описываются особенности строения, размножения и функционирования ветвистоусых рачков дафний и простейших, используемых в экотоксикологии, радиобиологии и радиоэкологии, анализируются эффекты радиационного воздействия на ракообразных, включая радиационно-индуцированные мутации, изменения плодовитости, выживаемости, устойчивости к заболеваниям, действие на процессы роста и дыхания, на изменение морфологических показателей и поведения, приводятся данные о поведенческой активности у простейших.

В главе «2. Место биотестирования в системе радиационного мониторинга водной среды» проводится сравнительный анализ особенностей современных физико-химических и биологических, включая биотестирование, методов оценки качества поверхностных вод и экологического состояния водных объектов. Подчеркивается, что физико-химические методы позволяют индивидуально определять микроколичества токсических соединений в объектах окружающей среды. Указывается, что они характеризуются такими недостатками как высокой стоимостью анализа, принципиальной невозможностью проведения анализа смесей веществ неизвестной природы и неспособностью оценить степень опасности выявленных количеств токсических соединений для биоты. Кроме того, постоянно возрастающий спектр ксенобиотиков за счет вновь синтезируемых веществ и поступление их в окружающую среду требует опережающей разработки новых методик и методов анализа и затрудняет своевременную оценку риска их присутствия в окружающей среде. И самое главное, эти методы не позволяют оценить степень негативного воздействия на биоту.

Как справедливо отмечает диссертант, биологические методы контроля окружающей среды лишены перечисленных выше ограничений, т.к. позволяют дать интегральную оценку ее качества и быстро ответить на вопрос: присутствуют ли в среде токсические агенты или неблагоприятные факторы в опасной для живого организма концентрациях и дозах. Среди них биотестирование является одним из наиболее эффективных и активно используемых современных методов биологической оценки качества водной среды. По чувствительности, оперативности и экономичности оно существенно превосходит все известные методы аналогичного назначения. Далее рассматриваются основные критерии выбора и принципы использования тест-объектов и тест-функций, условия проведения биотестирования, критерии оценки острого и хронического негативного воздействия тестируемых факторов, приводятся примеры используемых тест-организмов и тест-функций. Отмечается, что при биотестировании все чаще используются не отдельные биотесты, а системы (батареи) тестов, включающую тест-организмы разных трофических уровней и разные тест-функции, что позволяет дать комплексную оценку воздействия неблагоприятного фактора на биоту в целом. Диссертант отмечает, что одним из наиболее развитых направлений биотестирования является оценка качества водной среды. В Российской Федерации в качестве стандартных приняты тесты на ракообразных, водорослях, инфузориях и светящихся бактериях.

Особо подчеркивается, что в настоящее время в водной токсикологии, несмотря на громадное количество работ по оценке токсичности загрязняющих веществ, отсутствует система сравнительно-экотоксикологического анализа, которая позволила бы не только оценить действие вредных веществ и факторов на гидробионтов разных систематических групп, но и выявить среди них объекты, наиболее чувствительные и удобные для целей биотестирования. Важным моментом в этом является принадлежность тест-организмов к филогенетически разным уровням – от простейших до высших организмов и от одноклеточных до многоклеточных. Учитывая, что присутствие низких уровней радиации оказывается все более заметным в окружающей среде, необходимость поиска чувствительных тест-объектов и критериев для их оценки становится очевидной.

Автор делает заключение, что для создания существующих баз данных о чувствительности разных представителей биоты к радиационному фактору, следует больше внимания уделить беспозвоночным и простейшим. Однако, несмотря на экологическую значимость этих представителей гидробионтов, они не доиспользованы или проанализированы в незначительном объеме.

В главе 3 «Биологические эффекты и механизмы низкоинтенсивного неионизирующего излучения» рассматриваются характеристики и особенности действия техногенных электромагнитных полей (ЭМП) сверхслабого излучения, отличающиеся от естественных. Однако именно к ним живые организмы оказались наиболее чувствительными, вероятно, потому что по мощности они сопоставимы с эндогенными излучениями. Рассматриваются пути воздействия ЭМП на организм в зависимости от двух их составляющих характеристик: электрической и магнитной. Отмечается, что несмотря на многочисленные исследования, до настоящего времени достоверно не определены не только основные механизмы нетеплового действия ЭМП на биологические объекты, но и наличие самих биологических эффектов. Обсуждаются мембранная, ионная, полевая (нехимическая) и другие теории взаимодействия ЭМП с клеточными структурами. Предполагается, что антропогенные электромагнитные поля способны оказать негативное влияние на функциональное состояние биоты. Однако эти эффекты часто приписывают к воздействию более привычных и изученных экологических факторов. Большая часть главы посвящена рассмотрению примеров биологических эффектов ЭМП различного происхождения у разных видов организмов и их возможных механизмов. Подробно разбираются условия воздействия ЭМП, от которых зависит степень проявления биологических эффектов.

Итак, имеющиеся в литературе данные о нетепловом действии ЭМИ на биоту свидетельствуют о высокой чувствительности ее представителей к этому физическому фактору. По всей видимости, многие живые организмы обладают большей чувствительностью к ЭМП по сравнению с человеком. Существующие оценки риска ЭМП в значительной степени

полагаются на результаты многочисленных *in vivo* и *in vitro* исследований на млекопитающих или крупномасштабных эпидемиологических наблюдениях. Хотя эти исследования предоставляют важную информацию о биологических эффектах ЭМП, часто они очень трудоемки. Учитывая тот факт, что низкоинтенсивные ЭМП в последнее время вызывают особую озабоченность специалистов и населения, становится необходимым разрабатывать более чувствительные экспериментальные методы и модели для оценки эффектов радиочастотного излучения.

В заключительной части обзора литературы диссертант обосновывает возможность использования представителей ракообразных и простейших для решения обозначенных выше задач оценки биологических эффектов радиационного излучения и для оптимизации и развития основ экологической радиационной защиты.

В целом, обзорная часть выполнена на высоком уровне и свидетельствует о хорошем знании диссертантом изучаемой проблемы. Автор легко ориентируется в очень разноплановой литературе, владеет материалом, исходя из чего, четко формулирует цель исследования и ставит логически обоснованные задачи.

В главе «4. Материалы и методы, используемые в работе» (30 с.) описываются тест-культуры и методики культивирования модельного одноклеточного организма инфузории *Spirostomum ambiguum* и многоклеточного организма низшего ракообразного *Daphnia magna*. Детально рассматриваются установки, режимы и условия облучения γ -квантами, генераторные установки и схемы низкоинтенсивного радиочастотного облучения обоих тест-объектов, проведение дозиметрического контроля. Характеризуются методы анализа морфофункциональных изменений у простейших и ракообразных, описываются процедуры статистической обработки полученных данных. Объясняются и иллюстрируются методы биохимического анализа на ракообразных: анализ нарушения метаболизма МТТ-методом, анализ изменения уровня свободных радикалов методом привитой сополимеризации, анализ изменения уровня метилирования ДНК методом жидкостной хроматографии.

В целом можно отметить, что описание методов и процедур дается очень детально и четко. Особо следует подчеркнуть широкий набор современных методов, использованных в работе, которые хорошо соответствуют цели исследования и позволяют адекватно решать поставленные задачи.

Основная часть диссертационной работы представлена в главе 5. «Результаты экспериментов и их обсуждение» (64 с.), которая состоит из 3 разделов.

В разделе «5.1. Биологические эффекты γ -излучения у инфузорий и ракообразных» диссертант приводит результаты изучения прямых и отдаленных радиационно-индуцированных эффектов у инфузорий и ракообразных.

У инфузорий было исследовано влияние радиации на жизнеспособность, изменение поведенческой активности и морфометрические изменения в нескольких поколениях. Было установлено, что у вегетативно размножающихся инфузорий выявлено пролонгированное в 10 – 15 поколениях снижение выживаемости при остром γ -облучении исходных выборок в дозах от 50 Гр и выше. Эффект имеет нелинейную зависимость от дозы облучения, с ярко выраженным дозозависимым плато при средних дозах, что характерно для немишенного механизма действия облучения на клетку. Продемонстрировано, что выживаемость инфузорий при облучении индивидуальных линий ниже, чем при содержании в массовой культуре. Феномен связан с накоплением генетических повреждений в макронуклеусе в поколениях индивидуальных линий, делящихся только вегетативным путем, что приводит, в конечном итоге, к элиминации особей с повреждениями и снижению численности популяции. В массовой культуре, где размножение идет половым путем, выживаемость инфузорий остается высокой даже после облучения в дозах 1000 и 1500 Гр за счет быстрой элиминации особей с нарушенным генетическим аппаратом и участия в размножении только неповрежденных особей, что приводит к увеличению численности здоровой популяции.

В морфофизиологических тестах обнаружено, что в ранние сроки после облучения в дозах от 100 мГр ионизирующего излучения происходит значимое наследуемое снижение поведенческой активности, являющейся эволюционно-обусловленной формой физиологического состояния простейших. Продемонстрирована высокая чувствительность поведенческой активности инфузорий к радиационному воздействию в широком диапазоне доз, включая низкие и средние уровни.

Сравнение данных по выживаемости и двигательной активности инфузорий показало, что протяженность дозозависимого плато по критерию выживаемости значительно меньше, чем по изменению двигательной активности. Это связано с тем, что у исследуемых простейших уже при дозе около 50 Гр проявляются более сильно выраженные дозозависимые летальные эффекты, которые маскируют изучаемые изменения в подвижности инфузорий. Методом прижизненной компьютерной морфометрии выявлены морфологические патологии у 30 – 40 % особей на 4 – 7 сутки после γ -облучения в дозах от 1000 мГр. При этом повреждения могут проявляться не только в виде повышения вероятности гибели организма, но и в виде функциональных расстройств – нарушения поведенческой активности. Это показывает, что диапазон доз, при которых регистрируются немишенные эффекты, может быть сколько угодно широким.

Продемонстрировано, что действие γ -излучения вызывает у инфузорий морфометрические нарушения, проявляющиеся в изменении формы тела, которые сохраняются длительное время, нарушая функциональную активность инфузорий, и являются

«предвестниками гибели». Достоверно значимые эффекты проявляются на 4-е сутки при дозах облучения 20 Гр и выше.

Таким образом, результаты, полученные на инфузориях, показывают, что прямые и отдаленные радиационно-индуцированные эффекты можно оценивать не только по выживаемости клетки или организма, но по изменению поведенческих и морфометрических характеристик. Инфузории демонстрируют высокую чувствительность, как по признаку снижения двигательной активности, так и по увеличению частоты морфометрических нарушений. Морфометрический показатель является дополнительным биомаркером функциональных нарушений у облученных простейших. Полученные результаты могут быть положены в основу экспресс-анализа уровня радиационного загрязнения гидросферы. Это не только расширяет представления о биологическом действии радиации, но и открывает новые возможности для нормирования её влияния на биоту.

У ракообразных были исследованы радиационно-индуцированные эффекты изменения выживаемости, продолжительности жизни и плодовитости в нескольких поколениях. Установлено, что динамика выживаемости дафний при прямом воздействии низких и средних дозах облучения следует по качественно иному сценарию, чем при больших дозах. При облучении в дозе 0.01 Гр выживаемость не меняется, а при дозе 0.1 Гр происходит значимое снижение выживаемости ракообразных. В диапазоне доз 0.1 - 20 Гр наблюдается дозозависимый участок в виде «плато». При более высоких дозах (100 - 600 Гр) имеет место переход к линейной зависимости эффекта от дозы.

Показано, что выживаемость дафний в первом после облучения поколении (F_1) аналогична той, которая наблюдается у родительского поколения (F_0). Объяснение данного феномена - повреждения генетического материала в половых клетках родительского поколения. У потомства облученных дафний количество летальных событий увеличивается уже в ранние сроки и происходит значительно интенсивней, чем в контроле. При этом дозозависимый эффект не обнаруживается. Т.е., потомство F_1 проявляет качественно те же реакции, что и особи из облученной родительской популяции. В последующих поколениях F_2 и F_3 выявленные эффекты уже не проявляются.

Аналогичные радиационно-индуцированные закономерности были выявлены не только в смертности, но и в изменении продолжительности жизни: её снижение наблюдалось у облученного родительского и необлученного поколения F_1 , а в последующих поколениях F_2 и F_3 этот эффект уже отсутствует. Полученные диссертантом результаты свидетельствуют о возможности передачи в соматические клетки потомства геномной нестабильности, возникающей у особей облученной выборки и о постепенном затухании этих изменений в последующих генерациях.

Анализ общей плодовитости рачков и отдельных ее составляющих (число новорожденных на одну особь, число пометов и количество новорожденных на один помет) также показал наличие радиационно-индуцированных эффектов. При анализе данных диссертантом был использован методический прием, позволивший отделить эффекты излучения, непосредственно связанные с репродуктивными способностями (облучение половых клеток) и обусловленные снижением выживаемости взрослых дафний (облучение соматических клеток). Установлено, что прямое воздействие радиации в исследуемых дозах в поколении F_0 на генеративную составляющую плодовитости проявляется в уменьшении размера и числа пометов. В поколении F_1 число пометов не изменяется, а уменьшается только их размер. В поколении F_2 наблюдается восстановление репродуктивной способности дафний до исходного уровня, исключая группу с максимальной дозой облучения 10000 мГр, в которой плодовитость оставалась нарушенной. Особо следует отметить, что данное исследование диссертанта представляет собой одну из первых систематических попыток проанализировать наследственные эффекты облучения на плодовитость живых организмов, что стало возможным при использовании в качестве модельного организма дафний.

В разделе «5.2. Прямые и отдаленные эффекты радиочастотного излучения у инфузорий *S. ambiguum*» представлены результаты исследования радиационно-индуцированных изменений двигательной активности и морфофункциональных параметров под влиянием радиочастотных электромагнитных полей (РЧ-ЭМП) различной частоты (1 и 10 ГГц) и с тремя разными плотностями потока энергии (ППЭ) в ряду 10-15 поколений.

Было обнаружено значимое снижение подвижности инфузорий в результате воздействия при всех значениях ППЭ. Степень проявления эффекта и его характер положительно зависел от величины ППЭ и дозы, но оба показателя мало отличались при разных частотах РЧ-ЭМП. При относительно высокой ППЭ (0,1 и 0,5 Вт/м²) и дозами примерно до 300 Дж/м² подвижность инфузорий снижалась в равной степени, тогда как примерно такое же снижение на 50% подвижности после воздействия РЧ излучения с ППЭ 0,05 Вт/м² наблюдается при значительно более высокой дозе. При этом величина снижения двигательной активности простейших была одинаковой в широком диапазоне доз. При РЧ излучении с ППЭ 0,1 и 0,5 Вт/м² в дозе от 300 Дж/м² и выше и при ППЭ 0,05 Вт/м² в дозе от 1400 Дж/м² и выше происходит значимое наследуемое снижение двигательной активности, являющейся эволюционно-обусловленной формой физиологического состояния простейших. Важным заключением, сделанным диссертантом, является то, что кривая «доза – эффект» для двигательной активности инфузорий в РЧ-ЭМП с ППЭ 0,05, 0,1 и 0,5 Вт/м² имеет нелинейный характер. Используемый в данной работе экспресс-метод изучения двигательной активности инфузорий *S. ambiguum* может быть полезным для ранней диагностики радиационного воздействия на организм.

Дополнительно методом прижизненной компьютерной морфометрии в РЧ поле с ППЭ $0,5 \text{ Вт/м}^2$ в дозах от 900 Дж/м^2 и выше выявлены морфологические патологии у 30 – 40 % особей инфузорий. При всех исследуемых дозах эффекты были сходными как у непосредственно облученной выборки инфузорий, так и у их потомства, что указывает на передачу потомству эффекта облучения при вегетативном размножении простейших. Полученные автором результаты показывают, что метод прижизненной компьютерной морфометрии на простейших может быть предложен для ранней диагностики повреждающих уровней ЭМИ, при которых происходят морфометрические и двигательные нарушения инфузори. Данный показатель может быть применен в биологическом мониторинге в качестве дополнительного биомаркера радиационного воздействия на организм.

В разделе «5.3. Анализ прямых и отдаленных радиационно-индуцированных биохимических эффектов у ракообразных» приводятся результаты исследования изменений метаболизма дафний при действии радиации путем оценки активности митохондриальной сукцинатдегидрогеназы (МТТ-тест), уровня свободных радикалов методом привитой сополимеризации и уровня метилирования ДНК методом жидкостной хроматографии.

Методом МТТ-теста показано, что радиация в дозах 100-10000 мГр является индуктором, вызывающим нарушение метаболических процессов в митохондриях у облученных дафний и у их потомства в поколении F_1 . В поколении F_2 эффект нивелируется. Биохимические данные коррелируют с выживаемостью дафний.

Одновременно показано, что острое γ -облучение в дозах 100 и 1000 мГр вызывает повышение уровня свободных радикалов (СР) у *D. magna*. Усиление процессов образования СР, обнаруженное у облученных дафний, сохраняется и у потомства поколения F_1 .

В то же время, значимых отличий в метилировании ДНК не обнаружено ни при одной из исследованных доз ионизирующего излучения ни в поколении F_0 , ни в поколениях F_1 и F_2 . Полученные результаты свидетельствуют, что радиация не вызывает эпигенетических модификаций генетического материала у дафний, передающихся по наследству.

В разделе «Заключение» кратко, но логически связано обобщаются основные результаты, полученные в предыдущих разделах, подводится итог выполненной работы. Завершают работу Выводы.

Результаты работы имеют безусловную научно-теоретическую и практическую значимость. Они лежат в области приоритетных направлений развития науки и техники РФ «Науки о жизни» и «Рациональное природопользование» и критических технологий РФ по направлению «Технологии мониторинга и прогнозирования состояния окружающей среды, предотвращения и ликвидации ее загрязнения» и расширяют уже имеющиеся сведения о влиянии радиационного излучения на живые системы.

С научно-теоретической точки зрения в работе впервые на единой методологической основе проведен всесторонний анализ прямых и отдаленных (в нескольких пострадиационных поколениях) эффектов облучения у представителей двух филогенетических групп низших гидробионтов - инфузорий *S. ambiguum* и ракообразных *D. magna*, по изменениям ряда биологических показателей, вызванных ионизирующим и неионизирующим излучением в широком диапазоне доз, включая низкие и средние их уровни. Впервые выявлены диапазоны доз острого γ -облучения, вызывающие изменение продолжительности жизни и плодовитости у облученных *S. ambiguum* и *D. magna* и их потомства в ряду вегетативных и партеногенетических поколений. Впервые описан нелинейный характер кривой «доза – эффект» по изменению поведенческой активности простейших *S. ambiguum* при радиационном воздействии. Впервые описан процесс восстановления жизнеспособности ракообразных *D. magna* во втором пострадиационном поколении после острого γ -облучения исходной выборки. Впервые описаны закономерности формирования прямых и отдаленных эффектов облучения в электромагнитном поле сотовой связи у инфузорий *S. ambiguum*. Показана возможность применения поведенческого критерия для оценки радиационного стресса. Впервые предложены принцип системы построения биологического мониторинга для оценки радиационных эффектов острого облучения на простейших и ракообразных, основанный на анализе радиационно-индуцированных эффектов в нескольких пострадиационных поколениях и обоснована значимость использования для этих целей *Daphnia magna* в качестве тест-объекта. Биологические характеристики этих ракообразных хорошо изучены. Они являются одним из важных звеньев пищевой цепи водных экосистем и широко применяются в экотоксикологических исследованиях степени загрязнения гидросферы. Применяемый в лабораторных условиях анализ партеногенетических поколений дафний дает возможность изучить дозовый и временной интервал, при которых происходит восстановление популяции.

Практическая ценность работы состоит в доказательстве биологической значимости радиационных воздействий в низких и средних дозах от разных источников излучения как фактора окружающей среды, требующего контроля в рамках экологического мониторинга. На основании результатов работы предложено и экспериментально обосновано введение в практику радиационного контроля окружающей среды инфузорий *S. ambiguum* и ракообразных *D. magna* как доступных универсальных тест-объектов, пригодных для оперативных оценок. Доказана эффективность использования обоих тест-объектов для исследования прямых и отдаленных эффектов действия ионизирующих и неионизирующих излучений на организм, что позволяет не только ускорить получение результатов оценки, но и сделать такие исследования более экономичными и гуманными. Разработанная система биологического мониторинга на простейших и ракообразных внедрена в учебный процесс подготовки научных кадров всех уровней высшего профессионального образования (бакалавров, магистров и аспирантов) по

направлениям «Биология» и «Экология и природопользование» в Обнинском институте атомной энергетики – филиале национального исследовательского ядерного университета «МИФИ». Материалы диссертации включены в учебник «Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование», получившего рекомендательный Гриф Министерства образования и науки РФ в качестве учебного пособия для студентов вузов.

Работа в целом хорошо оформлена технически, отличается достаточным и доступным научным содержанием, четкостью и простотой литературного стиля изложения, ясностью мыслей, логичностью обоснования развиваемых положений. Цели и задачи, поставленные диссертантом, успешно решены, результаты получены на основе корректно поставленных экспериментов и с применением адекватных методов анализа, обработаны статистически, удачно проиллюстрированы и их достоверность не вызывает сомнений. Выводы сформулированы четко и полностью соответствуют поставленной цели и задачам. Работа представляет целостное, законченное исследование и имеет несомненную теоретическую и практическую ценность для радиобиологии и экотоксикологии. Её результаты прошли апробацию на многочисленных отечественных и международных конференциях и полностью отражены в рецензируемых научных изданиях.

По материалам исследования опубликованы 116 работ. Из них 5 статей в международных изданиях, 28 статей в рецензируемых журналах из перечня ВАК, в том числе 4 в переводных изданиях. Опубликовано два учебника с грифами Минобрнауки РФ и УМО по классическому университетскому образованию и 12 учебных пособий для студентов вузов. Автореферат в основных положениях отражает содержание работы.

Принципиальных замечаний методического, методологического и концептуального характера к работе нет. Имеются лишь некоторые замечания технического плана, изложенные ниже:

1. Не все сокращения включены в список в начале диссертации. Некоторые из них, например, МКРЗ, не расшифровываются ни в диссертации, ни в автореферате.
2. В диссертации на рис.10 (с. 112) и рис.12 (с. 117) нет пояснения, что обозначено красной стрелкой и обведено красным эллипсом. То же самое и в автореферате.
3. В диссертации в табл. 8 (с. 113) и 11 (с. 123) нет пояснения, с какой целью некоторые значения показателя выделены жирным шрифтом.
4. В диссертации в табл. 10 (с. 116) в примечании написано, что одной звездочкой «*» обозначено количество независимых серий опытов, двумя «**» – достоверно отличающиеся от контрольных значения показателя ($p < 0,05$). Однако одной звездочкой помечены также и некоторые значения. Что это значит?
5. В диссертации в табл. 17-19 (с. 150-155) что означают числа, указанные в круглых скобках в столбцах 1 и 2?

6. В диссертации в некоторых случаях смешиваются понятия «экспозиция» и «доза». Например, на с. 154 речь идет о дозе ППЭ 300 Дж/м^2 , а диссертант называет это экспозицией. Термин «экспозиция» характеризует временной аспект и выражается в единицах времени (секунды, минуты, часы, дни и т.д.).

Однако указанные замечания и вопросы не снижают достоинств рецензируемой работы. В целом диссертационная работа Е.И. Сарапульцевой представляет актуальное фундаментальное исследование, имеющее важное научно-теоретическое и практическое значение для радиобиологии и экологии и отражает высокий уровень квалификации автора как радиобиолога. Она имеет законченный вид и вносит весомый вклад в решение актуальных задач современной радиобиологии и экотоксикологии – действие радиационного излучения на организм и наследственная передача радиационно-индуцированных биологических эффектов, создание системы методов контроля и нормирования радиационного излучения различной природы в окружающей среде.

По актуальности, новизне, методическому уровню и научно-практической ценности работа соответствует требованиям ВАК РФ (п.8), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Елена Игоревна Сарапульцева, без сомнения, заслуживает присуждения ему искомой степени доктора биологических наук по специальности «03.01.01 – радиобиология».

17.03.2016 г.

Доктор биологических наук,
заведующий лабораторией физиологии
и токсикологии водных животных
Институт биологии внутренних вод РАН,
152742 п. Борок, Ярославская обл,
Некоузский р-н, ИБВВ РАН
Тел: 8 (48547) 24-116, e-mail: gko@ibiw.yaroslavl.ru

Чуйко Григорий Михайлович



Подпись Чуйко Г.М. удостоверяю
Зам. директора ИБВВ РАН
по научной работе, д.б.н., профессор

Комов В.Т.

17 » марта 2016 г.

Председателю
диссертационного совета Д 501.001.65
д. физ.-мат. наук, профессору Черняеву А.П.
от д. биол. наук Чуйко Г.М.

СОГЛАСИЕ

Я, Чуйко Григорий Михайлович, доктор биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия, заведующий лабораторией физиологии и токсикологии водных животных института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, согласен быть оппонентом по диссертации Сарапульцевой Елены Игоревны на тему «Прямые и отдаленные эффекты радиационного облучения у простейших и ракообразных», представленной на соискание учебной степени доктора биологических наук по специальности 03.01.01 – радиобиология.

Последние публикации по теме:

1. Песня Д.С., Романовский А.В., Чуйко Г.М., Шаров А.Н., Холодкевич С.В. Антиоксидантная система пресноводного двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea* Linn. в условиях краткосрочного изменения солености в эксперименте // Вода: химия и экология. – 2015. – №6. – С. 80-85.

2. Павлов Д.Ф., Чуйко Г.М., Павлов Д.Д. Рост мозамбикской тилляпии (*Oreochromis mossambicus* Peters) при хроническом действии кадмия, нафталина и ДДВФ // Биология внутренних вод. – № 1. – 2014. – С. 103-107.

3. Заботкина Е.А., Камшилова Т.Б., Чуйко Г.М. Изменение некоторых гематологических показателей молоди плотвы *Rutilus rutilus* L. при питании кормом, загрязненным полихлорированными бифенилами и хлорорганическими пестицидами // Токсикологический вестник. – № 3. – 2014. – С. 47-51.

4. Чуйко Г.М. Биомаркеры в гидроэкоотоксикологии: принципы, методы и методология, практика использования. Гл. XV // В кн. Экологический мониторинг. Часть VIII. Современные проблемы мониторинга пресноводных экосистем: Учебное пособие / Под ред. проф. Д.Б. Гелашвили, проф. Г.В. Шургановой. Нижний Новгород: Изд-во Нижегородского государственного университета, 2014. – С. 310-326.

5. Yurchenko V.V., Chuiko G.M. Hepatic ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) activity as a biomarker of exposure in bream (*Abramis brama*) from the Rybinsk reservoir, Russia // Journal of Applied Sciences Research. 2013. – Т. 9. – № 4. – С. 2598-2601.

Адрес: 152742 п. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, без улицы, д. 101.
тел/факс: (485)4724042 (админ.)
e-mail: gchuiko@mail.ru

Д.б.н.,
Зав. лабораторией физиологии
и токсикологии водных животных

Г.М. Чуйко

