

ОТЗЫВ

**официального оппонента доктора биологических наук
Снигиревой Галины Петровны
на диссертационную работу Сметаниной Надежды Михайловны
«Механизмы образования односторонних разрывов и щелочнолабильных
сайтов ДНК в лимфоцитах крови человека при воздействии УФА-
излучения», представленную к защите на соискание учёной степени
кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 –
«Радиобиология».**

Актуальность работы

Работа Сметаниной Надежды Михайловны посвящена изучению биологического действия длинноволнового УФ излучения, а именно, исследованию закономерностей образования односторонних разрывов и щелочнолабильных сайтов ДНК в лимфоцитах крови человека.

Мы постоянно находимся под воздействием естественного УФ излучения (солнечного света). Однако солнце весьма коварно, и его лучи не такие безобидные, как может показаться на первый взгляд. УФ излучение, которое дарит нашей кожи великолепный загар, может стать причиной онкологических заболеваний. На сегодняшний день имеются убедительные данные о повышенной заболеваемости раком кожи в регионах с высоким уровнем ультрафиолетового излучения, а также у людей, работающих вне помещений. Однако не все факты, касающиеся индуцированного УФ излучением рака кожи, поддаются объяснению. Проведенные исследования показали, что существует несоответствие между интенсивностью УФ облучения и, например, возникновением базалиомы: чаще всего она возникает в области глазницы, хотя щеки и височная область получают в 10 раз большую дозу ультрафиолета. Применение УФ излучения в медицине базируется в основном на противовоспалительном, антинеуралгическом и десенсибилизирующем действии этого вида энергии. В последние годы появились публикации о возможности лечения склеротических заболеваний кожи УФ излучением с длиной волны 340-400 нм, которое способно достаточно глубоко

проникать в кожу, по сравнению с другими ультрафиолетовыми спектрами (Morita A. et al., 2000; Ständer H. et al., 2002). Однако длительное и интенсивное ультрафиолетовое облучение может оказывать и неблагоприятное влияние на организм. Негативные эффекты, возникающие при воздействии УФ излучения на организм человека, могут приводить к ряду серьезных структурных и функциональных повреждений кожи. Работами многих зарубежных и российских ученых доказана роль УФ излучения длинноволнового спектра в этиологии фотостарения. Однако механизмы фотостарения до сих пор продолжают изучать с использованием современных биохимических и молекулярно-генетических технологий.

В связи со всем вышеперечисленным, актуальность диссертационной работы Сметаниной Н.М. не вызывает сомнения.

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

В основе диссертационной работы Сметаниной Н.М. лежит большой объем материала собственных исследований, которые были выполнены с применением двух методов: метода ДНК-комет и метода ДНК-гало с последующей статистической обработкой полученных данных.

Показано, что воздействие на лимфоциты крови человека УФ излучения с длинной волны 365 нм вызывает увеличение количества одонитевых разрывов и щелочнолабильных сайтов ДНК. Автором установлено, что наблюдаемые изменения носят линейный характер зависимости от дозы. При этом количество наблюдаемых одонитевых разрывов и щелочнолабильных сайтов ДНК сравнимо с количеством повреждений при облучении рентгеновским излучением в диапазоне доз от 0,5 до 1,0 Гр и при воздействии перекиси водорода в концентрации 10–25 мкмоль/л. При проведении экспериментальных исследований было выявлено также, что количество одонитевых разрывов и щелочнолабильных сайтов ДНК значительно снижается в присутствии ловушек

активных форм кислорода - диметилсульфоксида и азид натрия, а инкубация лимфоцитов крови человека в гипертоническом растворе NaCl с концентрацией 0,5 моль/л приводит к статистически достоверному увеличению спонтанных повреждений и увеличению повреждаемости ДНК УФ-излучением.

Таким образом, автором в целом выполнены все поставленные задачи исследования.

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

Достоверность полученных в работе результатов исследований не вызывает сомнения. Дозовые зависимости получены в результате анализа достаточно большого объема экспериментального материала – на каждую точку кривой проанализировано по 3 препарата от каждого донора (всего 30 доноров). При этом с каждого препарата регистрировали по 100 изображений. Визуализацию ДНК-комет и ДНК-гало проводили с помощью флуоресцентного микроскопа с использованием специальной системы визуализации изображений и программного обеспечения для их обработки.

Автором проведена сложная, трудоемкая, требующая опыта в данном разделе науки работа, и представлено профессиональное владение современными клеточными технологиями.

Значимость для науки и практики полученных результатов

Научная новизна работы заключается в том, что впервые проведён сравнительный анализ образования однонитевых разрывов и щелочнолабильных сайтов ДНК в лимфоцитах периферической крови человека при воздействии трёх различных повреждающих агентов: 365 нм УФ-излучения, рентгеновского излучения и перекиси водорода. Получены результаты, свидетельствующие о важной роли гидроксил-радикала и синглетного кислорода в образовании этих повреждений ДНК при воздействии 365 нм УФ-излучения. Изучено влияние инкубации лимфоцитов крови человека в гипертонических растворах NaCl на

повреждаемость ДНК лимфоцитов крови человека 365 нм УФ-излучением.

Представленная работа вносит существенный научный вклад в область фундаментальной радиобиологии, представляя новые данные по индукции повреждений ДНК лимфоцитов периферической крови человека при воздействии длинноволнового УФ излучения.

На наш взгляд, главным достижением работы является разработка достаточно простой, но в тоже время чувствительной модификация метода ДНК-гало для анализа одонитевых разрывов и щелочнолабильных сайтов ДНК в живых клетках. Данный метод может применяться для оценки чувствительности человека к воздействию УФ-излучения.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные Сметаниной Н.М. результаты могут быть использованы в научно-исследовательских и медицинских учреждениях, которые занимаются терапией с использованием УФ-излучения, для оценки индивидуальной чувствительности. Целесообразно использовать полученные в работе результаты как в учебном процессе при подготовке специалистов в области радиобиологии, так и при написании соответствующих методических рекомендаций.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Сметаниной Н.М., построенная по традиционному плану, состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы». Библиографический указатель включает 195 источников, из них 190 на иностранном языке. Материалы диссертации изложены на 100 страницах машинописного текста и включают 33 рисунка, 4 таблицы, и 1 приложение. Основные положения, выносимые на защиту, соответствуют содержанию работы, выводы вполне обоснованы.

Очень хорошо написан литературный обзор по теме диссертации, который показывает, что автором проведен глубокий, всесторонний анализ изучаемой проблемы и экспериментальных подходов, применяемых в данной области. В этом разделе подробно освещены такие вопросы как характеристика УФ излучения и его биологические эффекты. Особое внимание уделено механизмам образования повреждений ДНК при воздействии УФ излучения.

Подробно, со всеми деталями изложены методы, используемые в работе. Четко и понятно представлены результаты проведенных исследований. Как автореферат, так и собственно диссертация содержат исчерпывающую информацию по изучаемой проблеме, материал работы изложен очень хорошим научным языком и хорошо проиллюстрирован.

Диссертационная работа в целом является логичным, законченным, самостоятельным исследованием, имеющим как научную новизну, так и практическую значимость. Выводы и рекомендации достаточно обоснованы.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

Материалы диссертации нашли отражение в 7 опубликованных работах, из которых 5 статей напечатаны в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Принципиальных замечаний по поводу содержания и изложения материала диссертационной работы нет, но имеются следующие вопросы, требующие обсуждения:

1. В чем заключается суть модифицированного метода ДНК-гало и чем он отличается от «быстрого метода гало», разработанного итальянскими исследователями (Sestili и соавт.).
2. Вы впервые исследовали влияние ловушек активных форм кислорода-диметилсульфоксида и азид натрия на выход повреждений ДНК при воздействии УФ излучения. Известны ли Вам исследования аналогичного типа, но проведенные, например, с применением других методов исследования.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Сметаниной Надежды Михайловны на тему **«Механизмы образования одонитевых разрывов и щелочнолабильных сайтов ДНК в лимфоцитах крови человека при воздействии УФА-излучения»** на соискание ученой степени кандидата наук является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи – изучение биологического действия длноволнового УФ излучения, имеющей существенное значение для радиобиологии.

Работа соответствует критериям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 , а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.01.01 – «Радиобиология».

Официальный оппонент:

заведующая лабораторией молекулярной биологии
и цитогенетики

Федерального государственного бюджетного
учреждения «Российский научный
центр рентгенорадиологии» Министерства
здравоохранения Российской Федерации
доктор биологических наук

 — Г.П. Снигирева

Подпись д.б.н. Снигиревой Г.П. заверяю:

Ученый секретарь

ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России

доктор медицинских наук, профессор





З.С.Цаллагова

ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России

117997, г.Москва, ул.Профсоюзная, д. 86

Тел. (495) 334-92-88

E-mail: Snigiryova@rncrr.ru

Председателю диссертационного совета Д 501.001.65

при Московском государственном университете

имени М.В.Ломоносова

д. б. н., профессору Кудряшову Ю.Б.

Глубокоуважаемый Юрий Борисович!

Я, Снигирёва Галина Петровна, доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной биологии и цитогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии Минздрава РФ» согласна выступить в качестве официального оппонента по диссертации Сметаниной Надежды Михайловны на тему «Механизмы образования одонитевых разрывов и щелочнолабильных сайтов ДНК в лимфоцитах крови человека при воздействии УФА-излучения», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – радиобиология.

Публикации оппонента, близкие тематике диссертации:

1. Б.С. Федоренко, Г.П. Снигирева, А.А. Иванов. Цитогенетический анализ лимфоцитов крови космонавтов при действии малых доз космического излучения и его место в клинко-физиологическом мониторинге здоровья // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2010. Т. 44. № 3. С. 9-12.

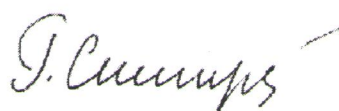
2. Б.С. Федоренко, Г.П. Снигирева, А.Н. Богомазова, Н.Н. Новицкая, В.А. Шевченко. Цитогенетические эффекты малых доз космического излучения в лимфоцитах крови космонавтов // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2008. Т. 42. № 3. С. 13-17.

3. Aseeva E.A., Snigiryova G.P., Neverova A.L., Novitskaya N.N., Khazins E.D., Domracheva E.V. Multiaberrant cells in groups of people exposed to radiation in different situations and their possible biological role // Biophysics. 2010. V.55. No.3. P.496-503.

Зав.лабораторией молекулярной биологии

и цитогенетики ФГБУ "РНЦРР" МЗ РФ, д.б.н.

Снигирева Г.П.



ОТЗЫВ

**официального оппонента о диссертации СМЕТАНИНОЙ Надежды Михайловны
"Механизмы образования односторонних разрывов и щелочнолабильных сайтов ДНК
в лимфоцитах крови человека при воздействии УФА-излучения", представленной на
соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности
03.01.01. – радиобиология**

Актуальность темы диссертации

Среди действующих на биоту и человека факторов, имеющих лучевую природу, оказался длинноволновый ультрафиолет. Однако в последнее время актуальность изучения биологического действия этой части солнечного спектра, называемого УФА с длиной волны от 315 до 400 нм, сильно возросла. Это побудило некоторых исследователей, среди которых оказалась Надежда Михайловна Сметанина, изучить молекулярные механизмы и особенности дозовой зависимости действия УФА-излучения на лимфоциты человека. Это имеет не только чисто академический интерес, ибо часть лимфоцитов человека в базальном слое кожи испытывает воздействие УФА-излучения на пляже, в соляриях или просто при работе в поле. Поэтому следует констатировать актуальность темы данной диссертации как с теоретической, так и с практической точек зрения.

Научная новизна, практическая значимость результатов работы Обоснованность положений, вынесенных на защиту

Целью данной работы явилось изучение молекулярных механизмов образования повреждений ДНК в лимфоцитах периферической крови человека при воздействии УФА-излучения. Руководящей идеей диссертационной работы стало несколько неожиданное даже для специалистов положение о том, что длинноволновый ультрафиолет способен приводить к образованию в клетках активных форм кислорода: синглетного кислорода и гидроксильных радикалов. Сама по себе такая постановка проблемы характеризуется несомненной научной новизной, независимо от результатов, которые были получены. В данной работе при формулировке задач исследования акцент был сделан на определение односторонних разрывов и щелочнолабильных сайтов ДНК при воздействии на лимфоциты человека *in vitro* УФА-излучения с длиной волны 365 нм. А также доказательство того, что данные типы повреждений ДНК являются действием гидроксильного радикала и синглетного кислорода. Исходя из данной идеологии также сформулированы положения, выносимые на защиту. Они четко сформулированы и являются отправной позицией всего содержания представленной диссертационной работы.

Структура диссертации

Что касается самой диссертации, которой необходимо дать оценку, то она написана по классическому образцу с "Обзором литературы", главой 2 "Материалы и методы", главой 3 "Результаты и обсуждение", обязательных разделов "Выводы" и списка литературы, содержащего 195 литературных источников. Следует также обратить внимание на Приложение с представленным в нем сертификатом на использование методики.

Из 100 страниц диссертации несколько перегруженным в текстовом выражении является раздел "Актуальность проблемы". Для такого, на мой взгляд, оригинального исследования, обладающего несомненной научной новизной, долго убеждать рецензентов и заинтересованных специалистов нет необходимости. Хотя, следует отметить, читается данная часть диссертации с интересом.

В самостоятельном плане представляет интерес "Обзор литературы", в котором приведена вся необходимая для дальнейшей работы информация. Как научный труд он заслуживает отдельного опубликования, т.к. представляет интерес не только для конкретных специалистов, но и всей заинтересованной в данной проблеме научной общественности, естественно с привлечением результатов, полученной в данной работе.

Обращают на себя внимание сведения, приведенные в Главе 2 "Материалы и методы". Подробно описаны использованные в работе методики, каждую из которых при необходимости может воспроизвести заинтересованный исследователь. Не удивительно, что в качестве основного метода определения повреждений ДНК выбран метод ДНК-комет. Лаборатория радиационной биофизики ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна является лидирующей в нашей стране в разработке и применении данного метода. Что же касается другого метода, а именно метода "ДНК-гало", то можно считать, что данный метод для целей решения радиобиологических задач в основном разработан доктором А.Н. Осиповым и диссертанткой в оригинальной редакции. Правда есть вопросы по количественному представлению результатов, насколько здесь велик компонент субъективизма. В целом же данный метод можно рассматривать как одно из существенных достижений данной диссертации. Это достижение закреплено соответствующей публикацией. Фактически, разработка данного метода и применение его для определения повреждений ДНК после действия рентгеновского облучения, перекиси водорода и, наконец, воздействия длинноволнового ультрафиолета могло стать темой самостоятельной диссертационной работы.

Но основная цель диссертации была другой и она достигнута с не меньшим успехом. Впервые показано, что УФА-излучение может при своем действии приводить к образованию разрывов ДНК и/или щелочнолабильных сайтов. Проведено сравнительное изучение образования такого рода повреждений при действии на лимфоциты рентгеновского излучения или перекиси водорода. С помощью использования молекулярных ловушек для активных форм кислорода (в диссертации они названы скавенджерами): для радикала гидроксила - диметилсульфоксида, а для синглетного кислорода - азида натрия, в диссертационной работе экспериментально доказано, что причиной или одной из причин при повреждении ДНК при облучении лимфоцитов длинноволновым ультрафиолетом являются активные формы кислорода. В свою очередь показано и тоже впервые, что хорошо всем известный молекулярным радиобиологам линкерный гистон H1 защищает ДНК при действии на клетки УФА-излучения. И, как уже упоминалось выше в настоящем отзыве, несомненно, важной и пионерской является разработка простой и воспроизводимой модификации метода ДНК-гало для определения повреждений ДНК. Это уже практическое воплощение работы, Другим практическим достижением работы является экспериментальное обоснование метода определения индивидуальной чувствительности клеток крови к длинноволновому ультрафиолету.

Замечания

Работу можно только приветствовать, поэтому принципиальных и даже существенных замечаний у оппонента нет.

Хочу обратить внимание, что современные методы молекулярной биологии позволяют отделять щелочнолабильный сайт от истинного одностороннего разрыва в ДНК, Можно надеяться, что это будет сделано при дальнейшей разработке метода "ДНК-гало".

Другие замечания по тексту диссертации таковы:

Стр.18. Почему УФА-лучи имеют меньшую энергию, но большую проникающую способность? Для ионизирующей радиации всё наоборот.

Стр.29. Что означает словосочетание "физиологические дозы УФА-излучение"?

Стр.35. Нет такого понятия как "вилки репарации".

В заключении к обзору литературы отмечается: "Дано поверхностное изложение физического и биохимического действия излучения" Оппонент не согласен с таким высказыванием диссертантки, ибо оно не только не украшает диссертацию, но и не соответствует действительности.

Заключение.

Научные положения, изложенные в диссертации Н.М. Сметаниной подкреплены информацией в пяти статьях, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации. Содержание автореферата диссертации в основных своих положениях соответствует содержанию основного текста работы. Положения, вынесенные на защиту аргументированно защищены. Выводы диссертации логично вытекают из полученных экспериментальных данных и отвечают содержанию поставленных задач. Работа, кроме научной новизны, имеет несомненное практическое значение.

Диссертация Н.М. Сметаниной представляет собой законченный научный труд, в котором автор разработал модификацию нового метода определения повреждений ДНК в клетках человека. С помощью этого метода определены количественные закономерности образования повреждений ДНК при действии длинноволнового ультрафиолета и выяснен механизм образования такого рода повреждений. По всем показателям диссертационная работа Н.М. Сметаниной отвечает требованиям ВАК Российской Федерации, которые сформулированы в пункте 7 "Положения о порядке присуждения ученых степеней" для кандидатских диссертаций по специальности 03.01.01. - радиобиология. Надежда Михайловна Сметанина заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук.

Отзыв направляется в Диссертационный совет Д 501.001.65 при биологическом факультете Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Профессор кафедры экологии
Обнинского института атомной энергетики –
филиала Национального исследовательского
ядерного университета "МИФИ"
(ИАТЭ НИЯУ МИФИ)
докт. биол. наук, профессор


26.09.14

Б.И. Сынзыныс

249040 г. Обнинск, Калужской обл., Студгородок – 1,
ИАТЭ НИЯУ МИФИ, кафедра экологии
Телефон: 8-910-512-02-67, e-mail : synzynys@obninsk.ru

Подпись Б.И. Сынзыныса заверяю.
Учёный секретарь Ученого совета
ИАТЭ НИЯУ МИФИ
докт. физ.-мат. наук, профессор



В.Л. Шаблов.

Председателю совета Д 501.001.65 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, созданного на базе МГУ им М.В. Ломоносова, д.б.н., профессору Кудряшову Ю.Б.

Уважаемый Юрий Борисович.

Я, Сынзыныс Борис Иванович, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры экологии Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» (НИЯУ МИФИ) Обнинский институт атомной энергетики (ИАТЭ) согласен быть официальным оппонентом по диссертации Сметаниной Надежды Михайловны на тему: «Механизмы образования односторонних разрывов и щелочнолабильных сайтов ДНК в лимфоцитах крови человека при воздействии УФ-излучения» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 — радиобиология.

По специальности оппонируемой диссертации имею _49_ научных работ, в том числе:

1. B.I. Sinzins, G.B. Smirnov, A.A. Saenko. Repair deficiency in *Escherichia coli* UV-sensitive mutator strain UVR502 // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1973. T53. C. 309.
2. Saenko A.S., Synzynys B.I., Brozmanova J., Pelevina I.I. Inducible processis in DNA replication and repair after Gamma, UV-irradiation and action of some chemicals in mammalian cells // Acta Biological Hungarica. 1990. T. 41. C. 223.
3. Сморязанова О.А., Сынзыныс Б.И., Данилин И.А., Баранова О.А. Содержание металлотионеинов в тканях и опухолях мышей при комбинированном действии кадмия и γ -излучения. Увеличение радиорезистентности мышей с повышенным уровнем металлотионеинов // Радиационная биология. Радиэкология. 2004. Т.44. № 2. С. 179-182.

О себе сообщаю:

Ученая степень: доктор биологических наук.

Шифр и наименование специальности: 03.01.01 — Радиобиология.

Ученое звание: профессор.

Должность: профессор кафедры экологии ИАТЭ НИЯУ МИФИ.

Место и адрес работы: 249040 г. Обнинск Калужской обл., Студгородок – 1, ИАТЭ НИЯУ МИФИ, кафедра экологии.

Телефон, e-mail : 8-910-512-02-67, synzynys@obninsk.ru.