УТВЕРЖДАЮ
проректор управления научной политики и
организации научных исследований МГУ
имени М.В.Ломоносова
_____
доктор физ-мат. наук, профессор
А.А. Федянин
«23» марта 2015 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова на диссертационную работу Тюниной Ольги Ивановны «Исследование механизмов действия монооксида углерода и УФ-света на структурно-функциональное состояние лимфоцитов и эритроцитов крови человека», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - Биофизика.

Актуальность темы

Диссертационная работа Тюниной О.И. посвящена актуальной теме - исследованию воздействия монооксида углерода и УФ-света на структурно-функциональное состояние лимфоцитов и эритроцитов крови человека, изучению реализации процессов программируемой клеточной гибели (апоптоза) и установление молекулярных механизмов ее дизрегуляции в данных условиях.

Монооксид углерода относится к новой группе регуляторных молекул, обладающий уникальными свойствами. Оксид углерода (II) образуется эндогенно с участием ферментативных систем и обладает высокой химической активностью. В настоящее время известно, что газовые трансмиттеры оказывают регулирующее влияние на реализацию апоптоза и имеют определенные клеточные мишени. По данным литературы, роль монооксида углерода в регуляции процессов программируемой клеточной гибели варьирует от активирующей до противоположной.

В свою очередь известно, что УФ-свет может индуцировать апоптоз в различных типах клеток, в том числе и клетках иммунной системы. В связи с вышеизложенным, исследования механизмов одиночного и комплексного воздействия монооксида углерода и УФ-света на структурно-функциональное состояние лимфоцитов и эритроцитов крови человека являются весьма актуальными.

Новизна полученных результатов и выводов

Диссертантом с помощью современных методов исследований: иммуноферментного анализа, проточной цитофлуориметрии, биохемилюминесценции, электрофореза в агарозном геле, сканирующей электронной микроскопии, спектрофотометрии, проведена работа по изучению одиночного и сочетанного воздействия монооксида углерода (время экспозиции – 60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м^2) на структурно-функциональное состояние лимфоцитов и эритроцитов крови человека. Результаты экспериментов получены в многократных повторностях и статистически обработаны.

Выявлено, что монооксид углерода (время экспозиции – 60÷90 мин.) проявляет антиапоптотическое действие за счет изменения баланса антиапоптозных белков (Bcl-2, сурвивина) в лизате лимфоцитов крови доноров. Установлено, что СО (время воздействия – 60÷90 мин.) вызывает гетерогенные изменения мембраны эритроцитов крови человека, а также приводит к нарушению их энергетического метаболизма. Показано, что воздействие УФ-света (240-390 нм) в дозах 151, 453 и 755 Дж/м^2 на лимфоциты крови человека оказывает проапоптотическое действие через рецепторопосредованный путь реализации апоптоза.

Таким образом, научная новизна проведенных автором исследований не вызывает сомнений.

Обоснованность выводов, сделанных автором, определена детальным научным анализом полученных экспериментальных данных. Сделанные выводы являются логическим отражением новых фактов и закономерностей,

полученных при выполнении данной работы. Диссертация является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение в области биофизики.

Анализ содержания диссертации

Содержание диссертации Тюниной О.И. изложено в логической последовательной форме на 174 страницах машинописного текста: состоит из «Введения», 6 глав, «Заключения», «Выводов». Список литературы представлен 184 наименованиями работ отечественных и зарубежных авторов. Иллюстрационный материал включает 47 рисунков и 11 таблиц в основном тексте.

В «Обзоре литературы» автор анализирует современные данные, полученные при изучении характеристик, особенностей строения и метаболизма лимфоцитов и эритроцитов крови человека. Диссертант подробно раскрывает молекулярные механизмы развития и регуляции апоптоза. Особое внимание уделяется работам, касающимся вопросов исследования действия УФ-излучения и монооксида углерода на состояние клеток крови.

Глава 2 посвящена описанию объектов и методов исследований. В диссертационной работе использован широкий спектр современных методов, адекватных поставленным задачам. Методы описаны достаточно подробно.

Результаты собственных экспериментальных исследований описаны в главах 3-6.

Диссертантом выявлено участие монооксида углерода (время воздействия – 60, 75 и 90 мин.) в дизрегуляции программируемой клеточной смерти. Так, показано уменьшение уровня экспрессии CD95 рецепторов на поверхности иммуноцитов, снижение параметров биохемилюминесценции и отсутствие изменений во фракции ДНК. В этой же части работы представлены результаты по исследованию воздействия монооксида углерода на изменение активности митохондриальных ферментов лимфоцитов крови человека.

Глава 4 посвящена изучению воздействия монооксида углерода на поверхностную архитектонику эритроцитов крови человека. С этой целью Тюнина О.И. проводит эксперименты с использованием сканирующего электронного микроскопа. В результате делает вывод о том, что монооксид углерода вызывает гетерогенные изменения поверхностной архитектоники в популяции эритроцитов. В данной главе также показано, что в ходе инкубации в атмосфере СО (время инкубации – 60, 75 и 90 мин.) наблюдается снижение энергетического потенциала эритроцитов крови человека.

Глава 5 посвящена исследованию действия УФ-света в дозах 151, 453 и 755 Дж/м^2 на лимфоциты крови человека. Диссертант также рассматривает структурно-функциональное состояние иммуноцитов после облучения лимфоидных клеток ультрафиолетовым светом. Показано, что УФ-свет в дозах 151, 453, 755 Дж/м^2 способствует инициации процессов программируемой гибели лимфоцитов.

В главе 6 представлены данные, полученные при исследовании сочетанного действия монооксида углерода и УФ-света на лимфоциты крови человека.

Результаты экспериментов Тюниной О.И. по изучению воздействия монооксида углерода и УФ-света на структурно-функциональное состояние лимфоцитов и эритроцитов крови человека позволили сделать диссертанту заключение о том, что монооксид углерода и УФ-свет вносят вклад в регуляцию программируемой клеточной гибели за счет включения в процесс антиапоптозных белков: Bcl-2 и сурвивина.

Особую значимость для изучения процессов регуляции антиапоптозными белками программируемой клеточной гибели лимфоцитов крови человека имеет применение в работе рекомбинантного интерлейкина-2. Так, показано, что при инкубации клеток в атмосфере СО (60, 75 и 90 мин.) в присутствии цитокина происходит повышение содержания антиапоптозного белка Bcl-2 с одновременным уменьшением содержания

белка сурвивина, что указывает на вовлечение в процесс дизрегуляции апоптоза белка Bcl-2.

Эксперименты, проведенные Тюниной О.И., позволили разработать схемы молекулярно-клеточных механизмов действия монооксида углерода и УФ-света на лимфоциты и эритроциты крови человека.

Содержание автореферата и сделанных по работе публикаций полностью отражают основные положения диссертации. Заключения и выводы диссертационной работы соответствуют целям и задачам проводившихся исследований, конкретны, адекватны полученным результатам и не вызывают сомнений. Работа хорошо апробирована на нескольких научных форумах и конференциях.

Теоретическая и практическая значимость

Исследовано воздействие монооксида углерода и УФ-света на структурно-функциональное состояние лимфоцитов и эритроцитов крови человека. Выявлено, что экзогенный монооксид углерода в физиологических концентрациях вносит вклад в регулирование программируемой клеточной гибели лимфоцитов крови человека за счет вовлечения в изучаемый процесс белка Bcl-2. Показано проапоптотическое действие УФ-света (в дозах 151, 453 и 755 Дж/м^2) и участие в этих процессах антиапоптозных белков.

Диссертация не только вносит определенный вклад в иммунологию, молекулярную биологию, фотобиологию и биофизику, но и обладает в высокой степени практической значимостью. Основные положения и выводы диссертационной работы Тюниной О.И. могут быть использованы научными сотрудниками научно-исследовательских институтов, а также лекторами в процессе изучения роли монооксида углерода и УФ-света в регуляции программируемой клеточной гибели, а также в преподавании вышеуказанных дисциплин.

В целом диссертационная работа заслуживает высокой оценки. Однако она не свободна от недостатков, к числу которых относятся следующие:

1. В «Обзоре литературы» особое внимание уделяется развитию программируемой клеточной гибели, ее механизмам и регуляции. Не совсем понятно, почему автором были выбраны для анализа антиапоптозные белки именно Bcl-2 и сурвивин?

2. Автором исследован уровень экспрессии CD8 рецептора на поверхности мембраны лимфоцитов крови человека. В свою очередь, хотелось бы уточнить, почему не был изучен уровень экспрессии CD4 рецептора на поверхности иммунокомпетентных клеток, после чего можно было бы рассчитать также иммунорегуляторный индекс?

3. Следует аргументировать, почему автором было выбрано время инкубации в атмосфере монооксида углерода 60, 75 и 90 мин.? Может ли за это время наступить апоптоз, наблюдаемый в Вашем исследовании?

4. Хорошо известно, что ряд физических и химических агентов вызывает гемолиз эритроцитарных клеток. В связи с этим, целесообразно получить ответ на вопрос о характере связи полученных диссертантом данных о состоянии эритроцитов человека с литературными данными о структурных нарушениях этих клеток.

Приведенные выше замечания и пожелания не снижают в целом высокой оценки рецензируемой работы. Диссертация Тюниной О.И. «Исследование механизмов действия монооксида углерода и УФ-света на структурно-функциональное состояние лимфоцитов и эритроцитов крови человека» является законченной научно-исследовательской работой. Работа соответствует требованиям п. 9 «Положения ВАК РФ», предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата биологических наук, а сам соискатель заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02. – Биофизика.

Отзыв обсужден и единогласно утвержден на заседании кафедры биофизики биологического факультета Московского государственного университета им. Ломоносова М.В. «23»марта 2015 г., протокол № 3

д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН Рубин А.Б.

Рубин Андрей Борисович
доктор биологических наук, профессор
заведующий кафедрой биофизики
Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова
119991, Москва, ГСП-2, Ленинские горы
+7(495) 939-1116
rubin@biophys.msu.ru

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ