

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Чемериса Н.К. на диссертацию Скамровой Галины Борисовны «Комбинированное действие слабого микроволнового излучения и ДНК-связывающихся препаратов на клетки буккального эпителия человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Представленная к защите диссертационная работа Скамровой Галины Борисовны посвящена изучению совместного действия электромагнитного излучения микроволнового диапазона и ароматических биологически активных соединений на клетки буккального эпителия человека. Актуальность данного направления обусловлена перспективой использования комбинированного действия лекарственных препаратов и электромагнитного излучения в терапии различных заболеваний.

Диссертационная работа написана в традиционном стиле и состоит из введения, 5 глав, выводов, списка использованных источников, который содержит 287 источников, и приложений. Иллюстрационный материал включает 44 рисунка и 9 таблиц в основном тексте, а также 1 рисунок и 16 таблиц в приложениях.

Целью работы Скамровой Г.Б. являлось выявление основных закономерностей в изменении состояния хроматина и электроотрицательности ядер, а также проницаемости мембран клеток буккального эпителия человека при комбинированном действии слабого микроволнового излучения и ДНК-связывающихся препаратов.

В обзоре литературы рассмотрены основные нетепловые эффекты действия микроволнового излучения на различные биологические системы, в частности на уровне ДНК, хроматина и клеточной мембраны. Соискатель проанализировал наиболее обсуждаемые молекулярные механизмы взаимодействия микроволнового излучения с клеточными системами. Были рассмотрены основные представления теории интерцепторного и протекторного действия ароматических соединений по отношению к ДНК. Особое внимание было уделено исследованиям биологических эффектов совместного использования микроволнового излучения и биологически активных соединений.

Для достижения поставленной цели автором предварительно было рассмотрено индивидуальное действие слабого электромагнитного излучения с различными параметрами на клетки человека. Полученные в результате исследования данные позволили установить факт действия слабого микроволнового излучения на буккальный эпителий, а также зависимость наблюдаемого эффекта от мощности и времени облучения. При воздействии на клетки ДНК-связывающихся веществ был обнаружен

концентрационно-зависимый эффект, проявившийся на уровне хроматина и ядер буккального эпителия, схожий с действием микроволнового излучения.

Проведенные автором исследования на клетках буккального эпителия выявили синергизм (защитное действие) как при комбинированном действии слабого микроволнового излучения и исследуемых препаратов, так и при совместном действии ДНК-связывающихся соединений с кофеином или C_{60} фуллереном. При этом представляет интерес тот факт, что кофеин и C_{60} фуллерен, не оказывая выраженного влияния на хроматин клеток буккального эпителия, значительно уменьшали эффект, вызванный электромагнитным излучением или ДНК-связывающимися препаратами. Полученные результаты могут открыть новые перспективы в использовании кофеина и C_{60} фуллерена для снижения потенциально генотоксического воздействия рассмотренных факторов.

Наблюдаемый биологический эффект при комбинированном действии ДНК-связывающихся соединений с C_{60} фуллереном на буккальный эпителий был проанализирован с точки зрения теории интерцепторного и протекторного действия. Экспериментальные зависимости количества гранул гетерохроматина от концентрации фуллерена удалось достаточно хорошо описать в рамках данной теории с предположением доминирования нековалентного комплексообразования (гетероассоциации) препарата с фуллереном. Возможность применения теории интерцепторного и протекторного действия к результатам, полученным на клетках буккального эпителия, была подтверждена при анализе действия препаратов в присутствии кофеина.

Автором был сделан вывод, что регуляция действия ДНК-связывающихся соединений может осуществляться посредством гетероассоциации и не зависеть от типа исследуемой клеточной системы.

С целью выявления схожих закономерностей на пролифелирующих клетках был проведен биоломинесцентный тест на основе морских светящихся бактерий, результаты которого хорошо согласовались с результатами, полученными на клетках буккального эпителия.

Проведенные автором исследования также продемонстрировали возможность применения исследования электрокинетических свойств ядер и состояния хроматина в качестве показателей биологического эффекта действия электромагнитного излучения и биологически активных соединений по отдельности и в комбинациях.

Следует отметить, что в процессе выполнения диссертационной работы автором были использованы современные методы исследований: микроскопия в видимом диапазоне, метод спектрофотометрии в УФ и видимом диапазоне, атомно-силовая

микроскопия, биоломинесцентный тест на основе морских светящихся бактерий. Состояние клеток буккального эпителия было исследовано методом определения степени конденсации хроматина в интерфазных ядрах клеток буккального эпителия, методом оценки изменения проницаемости клеточных мембран при окрашивании клеток раствором индигокармина, а также методом исследования электрокинетических свойств ядер с помощью клеточного микроэлектрофореза. Достоверность результатов проведенных экспериментов контролировалась с помощью методов статистического анализа данных.

По результатам проведенной работы опубликовано 11 работ, из них 3 в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

В целом, диссертационная работа производит положительное впечатление, полученные данные соответствуют высокому научному уровню, однако, имеются следующие вопросы, замечания и пожелания.

В обзоре литературы (стр. 27 - 29) диссертант сводит механизмы действия ароматических БАС к их комплексообразованию с ДНК, в числе таковых он рассматривает и «протекторное» действие кофеина по отношению к ДНК (обзор стр. 29). Если бы диссертант рассматривал только бесклеточные системы, то с такой предпосылкой можно было бы согласиться, однако при анализе действия кофеина на клеточном уровне необходимо рассматривать и основную его функцию, как блокатора фосфодиэстеразы, одного из ключевых ферментов цАМФ зависимого пути внутриклеточной сигнализации.

В разделе Методы (стр. 53 и далее) диссертант пишет, что "Раствор, содержащий клетки и фосфатный буфер, распределялся между несколькими эппендорфами (пробирками по 0.5 мл каждая). Затем эппендорфы помещались в чашку Петри. Телефон, находящийся в режиме разговора, располагался над предметными стеклами на расстоянии 3-4 см." Из текста совершенно непонятно откуда здесь взялись «предметные стекла», по-видимому имелась ввиду крышка чашек Петри - скорее всего это описка.

Первое замечание - голова человека и чашки Петри с эппендорфами имеют принципиально разную геометрию поглощающих ЭМИ тканей (объектов), поэтому считать, что УПМ этих объектов одинаковая, совершенно не корректно.

Второе замечание связано с тем, что мощность излучения мобильного телефона сильно зависит от расстояния до базовой станции, чем она дальше, тем излучение мобильного телефона более мощное. Исходя из первого и второго замечания следовало бы проводить прямое измерение изменения температуры образцов в процессе облучения. Не исключено, что она может повышаться в процессе эксперимента на несколько градусов.

Третье замечание – в экспериментах с мобильным телефоном следует учесть, что для кодировки сигнала мобильного устройства используют сложную фазо-частотную модуляцию, что также необходимо учитывать при интерпретации результатов, т.к. в этом случае мы имеем дело не с монохроматическим, а со сложно модулированным сигналом.

На стр. 55 соискатель, описывая методику облучения объекта (эппендорфы) в волноводе, указывает, что «Образец располагался в рассчитанных в соответствии с частотой и характеристиками волновода максимумах электрической и магнитной составляющей излучения, а также в положении, равноудаленном от данных максимумов. Это позволило сравнить реакцию клеток на электрический и магнитный компонент по отдельности не только с контрольным значением, но также и с реакцией на их совместное действие». Из текста диссертации (стр. 55) можно понять, что расчеты проводились для «пустого» волновода, а эксперименты - в условиях неоднородной нагрузки в волноводе. При этом следует ожидать появления в области эппендорфа нарушения однородности ЭМ поля с соответствующим изменением соотношения электрического и магнитного векторов. Хотелось бы услышать комментарии соискателя и по этому вопросу.

Обращает на себя внимание (стр. 56) сильная гетерогенность водных растворов гидрофобного немодифицированного фуллерена C₆₀ - от одиночных молекул до их кластеров диаметром 2-100 нм. Очевидно, что различные фракции фуллеренов могут обладать сильно различающимися физико-химическими свойствами. Интересно было бы услышать, учитывал ли соискатель гетерогенность коллоидных растворов при интерпретации полученных им результатов.

Промежуточный вывод к гл. 3.2.1. (стр. 66) - «Таким образом, ЭМИ с исследуемыми характеристиками изменяет функциональную активность клеток, что проявляется в увеличении количества гранул гетерохроматина" можно рассматривать как констатацию факта, поэтому с ним можно согласиться. Однако, требуется экспериментальное подтверждение того, что наблюдаемые эффекты не обусловлены тепловым нагревом объекта ЭМИ. Для доказательства этого необходимо привести данные по измерению изменений температуры объекта во время облучения с использованием тепловизионной техники или же хотя бы микротермометрии. Тот же вопрос относится и к главе 3.2.2, в которой рассматривается изменение показателя окрашенности клеток индигокармином, которое характеризует изменение проницаемости клеточной мембраны под действием электромагнитного излучения мобильного телефона.

Представленные замечания не снижают ценности диссертационной работы и носят скорее рекомендательный характер к будущим исследовательским работам.

В заключение отмечу, что по объему и качеству полученных данных, их новизне и актуальности работа Скамровой Г.Б. «Комбинированное действие слабого микроволнового излучения и ДНК-связывающихся препаратов на клетки буккального эпителия человека», выполненная под руководством д.ф.м.н., профессора Евстигнеева Максима Павловича, является законченным научным трудом, а содержание автореферата отражает основные положения диссертационной работы. Считаю, что диссертационная работа Скамровой Г.Б. соответствует требованиям п.9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Скамрова Г.Б. заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - биофизика.

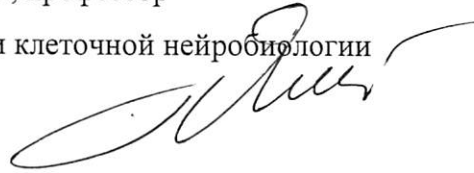
Чемерис Николай Константинович д.б.н., профессор
главный научный сотрудник лаборатории клеточной нейробиологии
Институт Биофизики клетки РАН.

г.Пушино, ул. Институтская д.3

142290, Россия

тел. (8)4967739104

Email: nkc@inbox.ru



2.12.14.

