

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки
Институт
биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН

(ИБР РАН)

ул. Вавилова, д. 26, Москва, 119334
Тел. 8 (499)-135-33-22 Факс 8 (499)-135-80-12
E-mail: info@idbras.ru
http://www.idbras.ru/
ОКПО 02699062, ОГРН 1027700450800
ИНН/КПП 7736044850/773601001

18.01.19 № 12506-01/14

На № 11-17/1780 от 29.11.2018

«У Т В Е Р Ж Д А Ю»

Директор
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института биологии развития
им. Н.К. Кольцова (ИБР РАН)

Член-корр. РАН, д.б.н.



А.В. Васильев

Отзыв ведущей организации

о научно-практической значимости диссертации

Жикривецкой Светланы Олеговны

на тему: «Транскриптомный анализ стресс-ответа и старения *Drosophila melanogaster*»,
представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности:

03.01.01 – Радиобиология.

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ВХОД №	95
ДАТА	21.01.2019
КОЛ-ВО ЛИСТОВ:	7
ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА Р	

Основными проблемами современной радиационной генетики являются изучение механизмов возникновения генетических изменений и управления радиочувствительностью генетического аппарата клеток как в сторону ее повышения (лучевая терапия), так и понижения (предупреждение вредных последствий облучения). В этом отношении актуально исследовать влияние различных стрессовых факторов на живые организмы, их жизнедеятельность и старение. Поскольку живые организмы постоянно сталкиваются с воздействием различных факторов именно низкой интенсивности, становится актуальным изучение не только механизмов повреждающего действия больших доз стрессовых факторов, но и влияния малых доз неблагоприятных факторов, которые

зачастую приводят к улучшению жизненных показателей организмов. Например, давно было описано явление индуцированной толерантности, когда умеренное воздействие на организм животного, будь то примитивный червь, муха или млекопитающее, вызывает его повышенную устойчивость к последующему летальному воздействию разного рода стрессам. Это явление называется в англоязычной литературе «hormesis». Тем не менее, научное признание идея гормезиса получила совсем недавно и активно изучается в настоящее время. Так, в недавней работе Нишида (Nishida, 2017) на нематоде *C. elegans* было показано, что повышенная устойчивость к солям мышьяка, осмотическому стрессу и голоду сохраняется не только у самих подвергнутых стрессу особей в течение их жизни, но и у их потомков.

Предполагается, что может существовать единый эволюционно сложившийся генетический механизм стресс-ответа, общий для различных воздействий у разных организмов. Исследовать этот механизм представилось возможным после развития технологий по тотальному секвенированию геномов и создания различных транскриптомных баз данных. Работа Жикривецкой Светланы Олеговны посвящена транскриптомному анализу стресс-ответа и старения у модельного организма *Drosophila melanogaster*.

Актуальность темы исследования не вызывает сомнений.

НОВИЗНА НАУЧНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в работе результаты обладают неоспоримой новизной и большой научной значимостью, поскольку впервые были обнаружены общие адаптивные механизмы ответа на малые дозы стресс-факторов разного типа: ионизирующая радиация, голодание, холодовой стресс, инфекционное заражение. Впервые описана полоспецифичность изучаемого феномена. Хочется отметить, что в данной работе впервые показана предполагаемая функция для гена *CG42751* - участие в стресс-ответе на ионизированное излучение.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Данные, полученные в настоящей работе по изучению роли генов стресс-ответа при малых дозах ионизирующих излучений, являются перспективными с точки зрения разработки методов и средств борьбы со старением, и продления жизни человека. Кроме того, результаты

работы следует учитывать при оценке потенциальной опасности естественных и искусственных источников радиации, в том числе при использовании радиоиммунотерапии.

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ДИССЕРТАЦИИ

Диссертационная работа Жикривецкой С.О. построена по традиционному плану и состоит из «Введения», «Обзора литературы», «Материалов и методов», «Результатов», «Обсуждения результатов», а также «Выводов» и «Списка цитируемой литературы». Работа изложена на 152 страницах текста, иллюстрирована 13 рисунками и 5 таблицами. Список цитируемой литературы включает 504 источника.

Во Введении автор лаконично обосновывает актуальность выбранной темы и формулирует цель и задачи исследования, выделяет научную новизну, практическую ценность, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробацию результатов работы, личный вклад, даёт сведения о публикациях и выступлениях на научных форумах. Цель исследования и задачи сформулированы корректно.

Глава «Обзор литературы» состоит из 6-ти разделов, в которых автор освещает генетические основы механизмов старения, даёт характеристику явления «гормезис», и описывает механизмы воздействия стресс-факторов разных типов. Отдельные разделы посвящены методам оценки уровня экспрессии мРНК, их сильные и слабые стороны. Глава «Обзор литературы» написана прекрасным научным языком, производит целостное впечатление и полностью соответствует названию и тематике диссертации.

В работе Жикривецкая С.О. использовала методики радиационной генетики, начиная с метода воздействия ионизирующей радиацией и заканчивая анализом дифференциальной экспрессии генов. В главе «Материалы и методы» соискатель описала процедуры грибкового заражения дрозофил, гипотермии и голодаания дрозофил. В этой главе представлены подробные методики анализа продолжительности жизни, оценки возрастной динамики локомоторной активности особей, а также протоколы количественной ОТ-ПЦР, создания генетических библиотек и их подготовку для высокопроизводительного секвенирования. Исследования проводились на сертифицированных и откалиброванных приборах. Перечислены статистические критерии, используемые для анализа полученных результатов. Это дает основание считать полученные данные достоверными. Использованные методы характеризуют автора как экспериментатора высокой квалификации в области радиационной генетики.

Достоинством экспериментальной части представленной к защите работы является безупречная логика, последовательность, тщательность проведения экспериментов и критичность оценки полученных результатов. Все эксперименты сопровождались строгим статистическим анализом, который не дает сомневаться в достоверности полученных результатов.

Экспериментальную работу Жикривецкая С.О. начинает с исследования продолжительности жизни особей *Drosophila melanogaster* в ответ на малые дозы ионизирующей радиации, в результате которого демонстрирует гормезис и особенности его полоспецифического проявления. Затем соискатель анализирует относительную экспрессию 29 генов в контрольных и экспериментальных образцах и выявляет 14 генов, достоверно меняющих свою экспрессию в созданных условиях облучения малыми дозами радиации.

Следующая серия экспериментов была посвящена анализу выживаемости особей, подвергнутых воздействию разных форм стресса. К ионизирующей радиации (в более высоких дозах) добавились грибковое заражение, голодание и гипотермия. В этих экспериментах автор показала достоверное снижение продолжительности жизни у самцов *Drosophila melanogaster* (самки, видимо, не исследовались) в ответ на все виды стресса, кроме гипотермии. Завершает работу обширный анализ экспрессии генов – транскриптомный анализ, в котором автор попыталась выявить общие дифференциально экспрессирующиеся гены в созданных условиях стресса, а также определила общие сигнальные пути и молекулярные процессы, реагирующие на разные типы стресса. В результате этого анализа соискатель показала, что общими, дифференциально экспрессирующими генами при воздействии применяемых стресс-факторов являются гены, отвечающие за метаболизм и, в частности, за биосинтез фолатов. Автор делает обоснованный вывод, что именно эти процессы должны играть ключевую роль в общем стресс-ответе. Экспериментальный материал хорошо документирован и иллюстрирован.

В главе «Обсуждение» автор оценивает свои результаты, сравнивая их с известными работами в данной области и с ранее полученными результатами собственных исследований.

Тем не менее, диссертация Жикривецкой С.О. содержит ряд погрешностей, на которые нам хотелось бы обратить внимание автора.

1. Не совсем правильно выражение «дифференциально экспрессированные гены» (стр. 8, 44, 59, 69, 71) правильно или дифференциально экспрессирУЮЩиеся гены или «дифференциально экспрессированные транскрипты генов».
2. На стр. 9 и далее сталкиваешься с англицизмом «Детоксикация». В русском языке есть слово – детоксикация.
3. На стр. 64-65 встречаем англицизм «активация сигналинга чекпоинта». Правильно: активация сигнального пути сверочных точек клеточного цикла.

4. На стр. 29 упомянуты «Тироидные» гормоны. Правильно - «тиреоидные» гормоны.
5. Странно звучит выражение «клетки организмов эукариот» (стр. 38). Можно было написать проще: «эукариотические клетки».
6. Вместо выражения «женская фертильность» в отношении дрозофил лучше использовать выражение «фертильность самок», также, как и вместо «мужских» и «женских» особей лучше просто писать «самцы» и «самки».
7. На стр. 54, в таблице 1 стоило бы указать последовательность 6-FAM-меченых проб для каждого гена, а также последовательности праймеров для референсных генов *RpL32*, *EF1alpha*. Кроме того в подписях к рисунку с графическим изображением относительной экспрессии анализируемых генов необходимо указывать референсный ген (какой из двух?) и контрольную пробу, которую брали за единицу в экспериментах с ОТ-ПЦР.
8. Встречается некоторая несогласованность в оценке результатов, например для гена *CG42751* сначала на стр. 73 было написано, что он экспрессируется «в 84 раза больше», потом несколькими строками ниже было написано, что в данном исследовании была обнаружена «сниженная экспрессия гена *CG42751*». При этом даётся ссылка на рис. 3.3., которого нет в тексте диссертации, но мы нашли этот рисунок в тексте статьи авторов (Zhikrivetskaya et al., 2015) и поняли, что этот ген всё-таки снижает свою экспрессию.
9. На стр. 74: «Ген *Surba20* ... сверхэкспрессирован сразу после воздействия 5 сГр радиации (2,3 раза) и низко экспрессирован в ответ на 40 сГр (2,5 раза)». Но почему повышение экспрессии в 2,3 автор называет «сверхэкспрессия», а в 2,5 раза – это «низкоэкспрессирован»????? Вероятно, автор имеет ввиду повышение и понижение экспрессии гена. Но своими терминами «сверхэкспрессирован» и «низкоэкспрессирован» вводит читателя в заблуждение.
10. Осталось непонятно рассуждение: «Возможно, эффект генов немедленной реакции на радиацию различается среди образцов, подвергнутых воздействию разных доз радиации, может быть объяснено тем, что более высокая суммарная доза требует более длительного времени облучения. Поэтому у образцов с более высокой дозой точка измерения, обозначенная как «сразу после воздействия», фактически наступает гораздо позже, чем у образцов с меньшей дозой, что может выразиться в смещение экспрессионного ответа у этих образцов.» (стр. 74). Что хотел сказать автор? И для чего высокая суммарная доза требует более длительного времени облучения? Что за образцы с «более высокой дозой»?
11. Что можно понять из предложения на стр. 91: «Воздействие радиации привело к пропорциональному дозе негативный эффект более высоких доз ионизирующей радиации

обусловлен в наибольшей степени именно повреждениями макромолекул», где нет знаков препинания и падежного согласования?

12. В списке литературы нет единого оформления ссылок. Кроме того, 21 источник в списке литературы зачем-то содержит надпись «No abstract available».
13. В автореферате сказано, что «*Работа изложена на 84 страницах машинописного текста и содержит 4 таблицы...*», однако работа изложена на 152 стр. и содержит 5 таблиц. К тому же работа не содержит «Приложения», о котором упомянуто в автореферате в разделе «Структура и объем диссертации» и количество упомянутых источников (473 вместо 504) также не совпадает.

Перечисленные замечания, однако, относятся исключительно к оформлению выполненной работы и не снижают её общей ценности.

По диссертационной работе к автору есть несколько вопросов.

1. Как соотносятся понятия «продолжительность жизни» и «старение»? равнозначны ли они? Можно же долго жить в «старости» и наоборот?
2. Чем можно объяснить неоднозначный эффект проявления гормезиса у самок при воздействии малыми дозами радиации: проявление эффекта при 5 и 40 сГр и его отсутствие при 10 и 20 сГр?

В целом, диссертационная работа Жикривецкой С.О. представляет собой законченный научно-исследовательский труд. Она выполнена на высоком методическом уровне. Результаты представлены в пяти выводах, которые полностью соответствуют поставленным задачам.

Содержание работы отражено в 4 международных публикациях в ведущих рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Результаты исследований были доложены на международной конференции в 2015 г.

Текст автореферата в достаточной мере отражает содержание диссертационной работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Жикривецкой С.О. «Транскриптомный анализ стресс-ответа и старения *Drosophila melanogaster*», выполненная под руководством д.б.н., профессора РАН, член-корреспондента РАН Москалёва Алексея Александровича, является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научно-методологическом уровне с использованием современных методов исследования. Результаты, приведённые в работе, представляют высокую значимость для решения проблем радиационного гормезиса и старения. Диссертационная работа по содержанию, актуальности, новизне, научному и методическому уровню, практической ценности

полученных результатов полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, соответствует заявленной специальности - 03.01.01 "Радиобиология", а ее автор, Жикривецкая Светлана Олеговна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – Радиобиология.

Отзыв на диссертационную работу Жикривецкой С.О. заслушан, обсужден, одобрен и утвержден на объединенном семинаре лабораторий: молекулярно-генетических процессов развития, эволюционной генетики развития, эволюции генома и механизмов видообразования 17 декабря 2018 г. (Протокол № 8 от 17.12.2018 г.).

Заведующая лабораторией молекулярно-генетических процессов развития
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН)

доктор биологических наук,
Симонова Ольга Борисовна



/ Симонова О.Б./

Сведения о составителе отзыва:

Симонова Ольга Борисовна, доктор биологических наук по специальности 03.02.07 – "генетика", заведующая Лабораторией молекулярно-генетических процессов развития Федерального государственного бюджетного учреждение науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук.

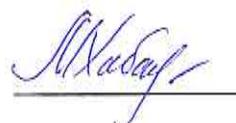
Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова 26

Телефон: 8(499)135-20-97

Электронная почта: osimonova@hotmail.com

«Подпись Симоновой О.Б. удостоверяю»

Ученый секретарь ИБР РАН,
зав. аспирантурой,
кандидат биологических наук, доцент
Хабарова Марина Юрьевна



/ Хабарова М.Ю./

Дата: 29 декабря 2018 года.