

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт экологии растений и животных
Уральского отделения РАН
член-корр. РАН
В.Д. Богданов
«29» декабря 2016 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института экологии растений и животных Уральского Отделения Российской академии наук (ИЭРиЖ УрО РАН) на диссертационную работу **Чернышовой Дарьи Олеговны «Возраст-зависимые изменения жизнеспособности и профиль экспрессии генов стресс-ответа *Drosophila melanogaster* при воздействии химических и физических стресс-факторов»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биология)

Актуальность темы выполненной работы

Диссертация Чернышовой Дарьи Олеговны представляет собой комплексное исследование возраст-зависимых изменений физиологических показателей и профиля экспрессии генов стресс-ответа *Drosophila melanogaster* после воздействия малых доз факторов химической (формальдегид, толуол, диоксин) и физической природы (ионизирующая радиация). Изучение физиологических и морфологических реакций видов, популяций и отдельных организмов в результате воздействия различных факторов окружающей среды остается актуальной задачей факториальной экологии. Экологические факторы различной модальности влияют на интегральные показатели жизнедеятельности организма, в том числе, на продолжительность жизни особей, их поведение и плодовитость. В работе Чернышовой Д.О. в качестве изучаемых факторов выбраны 2,3,7,8-тетрахлордибензо-р-диоксин, толуол, формальдегид и ионизирующее излучение, которые широко распространены в окружающей среде, что предполагает их постоянное воздействие на биологические системы. Как выяснилось, повреждающие факторы могут оказывать как негативное действие, так и активировать защитные системы организма, способствуя развитию эффекта гормезиса. Согласно современным представлениям, низкоинтенсивные стресс-факторы влияют на организм опосредованно через изменение экспрессии определенных генов. Поэтому актуальной задачей становится разработка систем их детекции, особенно при воздействии в малых дозах. Механизмы стресс-ответа являются эволюционно консервативными, общность механизмов ответных реакций на воздействие стресс-факторов у насекомых и человека предполагает, что в

перспективе, появится возможность экстраполяции результатов. В свете сказанного актуальность темы диссертации Д.О. Чернышовой и ее практическое значение не вызывают сомнений.

Научная новизна и достоверность результатов

Научная новизна рецензируемой диссертации заключается в том, что впервые на обширном материале проведен сравнительный анализ эффектов и молекулярных механизмов влияния малых доз выбранных для исследования экотоксикантов на организм *Drosophila melanogaster*. Установлено, что воздействие изучаемых факторов может приводить к гормезису, выражающемуся в увеличении продолжительности жизни, локомоторной активности и плодовитости. На основе анализа изменений профиля экспрессии генов стресс-ответа выявлены специфические (репродуктивная токсичность, нейротоксичность, иммуносупрессия и др.) и универсальные (оксидативный стресс, индукция апоптоза, повреждение ДНК, генотоксический стресс, цитотоксический стресс) механизмы воздействия исследуемых химических веществ и ионизирующего излучения. Установлены общие механизмы ответа на изучаемые воздействия - активация генов антиоксидантной защиты, генов репарации ДНК и генов поддержания нативной структуры белков.

Данные тщательно обработаны с применением современных статистических программ. В целом объемы и содержание полученных материалов выглядят достаточными для решения поставленных в работе задач. Автором получены новые для науки результаты, которые описаны в соответствующих разделах диссертационной работы и автореферата и представлены в открытой печати. По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах из перечня ВАК Минобрнауки РФ. **Автореферат** отражает основное содержание диссертации, снабжен необходимыми таблицами и рисунками.

Значимость результатов для науки и практики

Диссертация Д.О. Чернышовой представляет собой фундаментальное исследование и вносит вклад в копилку наших знаний о закономерностях и основных механизмах влияния малых доз экотоксикантов и γ -излучения на *Drosophila melanogaster*. В работе содержатся новые сведения, доказывающие, что основными механизмами влияния малых доз 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-парадиоксина, толуола, формальдегида и γ -излучения на живой организм являются оксидативный стресс, индукция апоптоза, повреждение ДНК, генотоксический стресс, цитотоксический стресс. Результаты работы раскрывают роль исследуемых генов стресс-ответа в реакции целого организма. Наличие ортологов исследуемых генов в геноме человека и других млекопитающих открывает возможности экстраполяции полученных данных на эти группы организмов, позволяя выявлять

механизмы стресс-ответа и адаптации организмов к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Очевидно и практическое значение проведенных исследований. Полученные результаты могут быть использованы в учебном процессе ВУЗов биологического профиля: в лекционных курсах по гено- и экотоксикологии, радиационной генетике, а также при планировании работ по экобиомониторингу.

Структура и содержание работы

Работа изложена на 151 странице машинописного текста, включает 12 таблиц, иллюстрирована 49 рисунками. Структура диссертации подчинена задаче наиболее полного изложения материалов. Диссертация состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов), выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 414 источников, в том числе, 383 публикации из зарубежных изданий.

Во **Введении** автором сформулированы актуальность темы исследования, цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлены положения, выносимые на защиту. Здесь же приведены сведения о личном вкладе автора и апробации результатов работы. *Отметим использование слишком объемных ссылок в данном разделе.*

В **первой главе** рассмотрены данные литературы по основным эффектам и механизмам влияния изучаемых факторов (2,3,7,8-тетрахлордибензо-р-диоксина, толуола, формальдегида и малых доз ионизирующего излучения) на живые системы на разных уровнях организации. *Отметим иногда излишнюю подробность в описании эффектов изучаемых воздействий. Использовано мало русскоязычных источников литературы.*

Вторая глава представляет собой описание материала и методов исследования. Используемые в работе методы в настоящее время считаются общепринятыми, в данном исследовании представляются вполне оправданными, описаны достаточно подробно для получения информации о методике постановки экспериментов и последующей обработки результатов.

Отметим два положительных момента: 1) детальную проработку литературного материала, которая позволила выбрать оптимальные дозы и режимы воздействия изучаемых факторов; 2) использование двух современных методов (GFP-репортеров и ПЦР-анализа в «реальном времени») для оценки влияния изучаемых воздействий на экспрессию генов стресс-ответа, что подчеркивает надежность фактологического фундамента и обоснованность полученных выводов.

Замечание: не ко всем формулам приведен список обозначений введенных величин (формулы 1, 3, 5).

Третья глава является основной, состоит из 4-х разделов, в которых представлены конкретные результаты работы, полученные в соответствии с поставленными задачами. Детально в стандартных условиях по единой схеме рассмотрено действие каждого из трех химических факторов и ионизирующего излучения на интегральные параметры жизнедеятельности дрозофил (продолжительность жизни, плодовитость, локомоторную активность). Проведена оценка изменения профиля экспрессии генов иммунного ответа, генов регуляции стресс-ответа и апоптоза, генов детоксикации свободных радикалов и ксенобиотиков, генов конформации белков и генов репарации ДНК. Динамика экспрессии генов стресс-ответа оценена не только *in vitro*, но и *in vivo*.

Работу отличает тщательность и скрупулезность в проведении экспериментов, стремление унифицировать данные, что облегчает восприятие материала и, несомненно, является достоинством работы. К другим достоинствам работы, помимо содержащегося в ней материала, можно отнести квалифицированный подход к анализу данных. Показан эффект гормезиса при действии малых доз ионизирующего излучения, выраженный в увеличении параметров плодовитости *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Canton-S* и снижении смертности на преимагинальных стадиях развития.

Отметим важный аспект, касающийся возрастной динамики показателей плодовитости (фекундности и фертильности) самок *Drosophila melanogaster* при воздействии толуюла и диоксина, что возможно было выявить только при дифференцированном анализе изучаемых показателей. Однако возникает вопрос: с чем может быть связано столь выраженное увеличение плодовитости в раннем возрасте и, напротив, снижение в зрелом, ведь известно, что животные на ранних стадиях онтогенеза являются более чувствительными к неблагоприятным воздействиям?

Замечания по главе:

1. Не все графики хорошо читаемы, так как содержат большой объем информации, их можно было бы дополнить таблицами.
2. Подписи оси Y на рис. 29-44 двусмысленны: $\log_2FC$ это не то же самое, что $\log_2FC$. В тексте диссертации на стр. 43 указано, что «на гистограммах отображали показатель $\log_2FC$ ». Однако в автореферате в примечаниях к табл. 1 без всяких пояснений снова прописано $\log_2FC$.

В **четвертой главе** проанализированы полученные данные, проведено их сравнение с данными литературы. Глава совсем небольшая (всего 12 стр.), но в ней лаконично обсуждены эффекты каждого исследованного фактора на модельный объект. Автором предприняты успешные попытки связать эффекты, выявленные на организменном уровне с изменением профиля экспрессии генов стресс-ответа, что

также является достоинством работы. Особого внимания заслуживает схема (с. 116), в которой обобщены собственные и литературные данные об универсальных и специфических эффектах воздействия малых доз всех анализируемых факторов.

Общее замечание по работе. Есть неудачные выражения (средний возраст продолжительности жизни, долгий период полураспада, патологические заболевания человека и др.), опечатки, стилистические и пунктуационные ошибки.

Однако все указанные замечания не снижают ценности диссертационной работы, ее научной и практической значимости. Работа выполнена на современном научном и методическом уровнях, использован репрезентативный фактический материал, который обработан адекватными статистическими методами, что обеспечивает достоверность полученных результатов.

Выводы диссертации сформулированы четко, отражают решение поставленных задач, соответствуют результатам работы. Результаты работы прошли апробацию на многочисленных конференциях и в публикациях.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации и результаты проведенного исследования соответствуют паспорту научной специальности 03.02.08 – экология (биология).

Заключение

Диссертация Чернышовой Д.О. является завершенной научно-квалификационной работой. Мы высоко оцениваем проведенное исследование, итоги которого вносят **весомый вклад** в понимание механизмов контроля жизнеспособности и стрессоустойчивости организма. На всех этапах выполнения работы автор внес в нее значительный **личный вклад**: участие в постановке и решении задач исследования, проведение большей части экспериментов, обработка, анализ, интерпретация и обобщение результатов, формулирование выводов, подготовка публикаций. Вклад автора в совместных публикациях составил 70 %.

У нас нет сомнений, что диссертационная работа «Возраст-зависимые изменения жизнеспособности и профиль экспрессии генов стресс-ответа *Drosophila melanogaster* при воздействии химических и физических стресс-факторов», соответствует основным критериям пп. 9-14 Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 “Положения о порядке присуждения ученых степеней” и отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор - **Чернышова Дарья Олеговна**, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биология).

Отзыв ведущей организации подготовлен старшим научным сотрудником лаборатории популяционной радиобиологии, кандидатом биологических наук Григоркиной Еленой Борисовной и заведующей той же лабораторией, доктором биологических наук Позолотиной Верой Николаевной. Отзыв утвержден на основе коллективного обсуждения диссертации на научном заседании лаборатории популяционной радиобиологии ФГБУН Институт экологии растений и животных УрО РАН (протокол № 1 от 28 декабря 2016 г.).

Адрес ИЭРиЖ УрО РАН: 620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202, тел.: + 8 (343) 210-29-53; Факс: (343) 266-64-82; E-mail: common@ipae.uran.ru

Кандидат биологических наук, доцент,
старший научный сотрудник
лаборатории популяционной радиобиологии
Института экологии растений и животных УрО РАН Григоркина Елена Борисовна
620144, г. Екатеринбург
ул. 8 Марта, 202; (343)-2103858 (244);
эл. адрес: grigorkina@ipae.uran.ru

Доктор биологических наук,
заведующая лабораторией
популяционной радиобиологии
Института экологии растений и животных УрО РАН Позолотина Вера Николаевна
620144, г. Екатеринбург
ул. 8 Марта, 202; (343)-2103858 (118)
эл. адрес: pozolotina@ipae.uran.ru