

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу Чернышовой Дарьи Олеговны на тему «**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

Актуальность темы выполненной работы

Диссертационная работа Дарьи Олеговны Чернышовой посвящена изучению воздействия малых доз химических (формальдегид, толуол, диоксин) и физических (радиация) генотоксикантов на физиологические показатели и паттерн экспрессии генов у *Drosophila melanogaster*. Актуальность темы исследования обусловлена тем обстоятельством, что все перечисленные факторы являются широко распространенными экотоксикантами, которые оказывают неблагоприятное воздействие практически на все системы органов живых организмов. Большинство проведенных в этой области исследований ориентируется на изучение изменений, вызванных воздействием различных химических соединений антропогенной природы, на организменном и молекулярном уровнях. Исследования, затрагивающие популяционный уровень (плодовитость, продолжительность жизни, изменения активности, половое и пищевое поведение) при воздействии низких дозах экотоксикантов по сей день немногочисленны.

В соответствии с этим, целью диссертационной работы Д.О. Чернышевой являлось изучение возраст-зависимых изменений физиологических показателей и анализ профиля экспрессии генов стресс-ответа особей *Drosophila melanogaster* после воздействия малых доз факторов химической (формальдегид, толуол, диоксин) и физической природы (ионизирующее излучение).

Работа выполнена в рамках научно-исследовательских работ лаборатории молекулярной радиобиологии и геронтологии Отдела радиозэкологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук при поддержке грантами целевой программы «Молекулярная и клеточная биология» (№ 12-П-4-1005), гранта Президента РФ (№ МД-1090.2014.4), научного проекта для молодых ученых и аспирантов УрО РАН (№ 14-4-НП-103).

Новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

В работе Д.О. Чернышевой впервые проведено детальное исследование эффектов и молекулярных механизмов воздействия малых доз экотоксикантов (формальдегида, толуола, диоксина и радиации) на *Drosophila melanogaster*. В ряде случаев показана реальность гормезиса, который выражался в увеличении различных показателей продолжительности жизни, локомоторной активности и плодовитости.

Показано также, что изменения профиля экспрессии генов стресс-ответа существенно более выражены у самцов по сравнению с самками. Особенно это касается экспрессии генов детоксикации свободных радикалов и ксенобиотиков (Cyp4e2, Sod1, Sod2, Catalase), генов репарации ДНК и белков (Hsp70Aa, Mus209, mus210, Rrp1, spn-B), а также гена регуляции стресс-ответа D-Gadd45.

На основании анализа полученных экспериментальных данных сделан вывод о том, что основными механизмами стресс-ответа при действии формальдегида, толуола, диоксина в малых концентрациях и малых доз ионизирующей радиации являются ответ на окислительный стресс и связанное с ним повреждение ДНК и белков.

Выводы сформулированы корректно и соответствуют поставленным задачам исследования.

Достоверность результатов исследования

Автором проанализирован огромный массив экспериментальных данных. Для каждого из 8 вариантов генотоксического воздействия (3 химических соединения + радиация в 2 вариантах дозовой нагрузки) изучались:

- кривые выживания (150-170 особей в 3 повторностях);
- оценки плодовитости (60-75 самок);
- измерения спонтанной локомоторной активности (10 мух в 3 повторностях);
- изменения паттернов экспрессии 20 генов (2 метода).

Молекулярные исследования выполнены на современном методическом уровне. Экспрессия 20 генов измерялась методом количественного ПЦР в «реальном времени» с этапом обратной транскрипции. Кроме того, экспрессию исследуемых генов оценивали *in vivo* путем регистрации изменения уровня флуоресценции репортерного белка GFP.

Проведена корректная статистическая обработка результатов исследования с использованием современных статистических методов, включая регрессионный анализ, непараметрические статистики и анализ кривых выживания.

Полученные в работе результаты и сформулированные выводы полностью соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Обзор литературы, молекулярно-генетические исследования и их анализ свидетельствуют о хорошей теоретической и методической подготовленности диссертанта. Сделанные выводы обоснованы и логически вытекают из результатов исследования. Основные материалы диссертации

опубликованы в 15 печатных работах, из них 3 статьи в престижных зарубежных журналах с высоким импакт-фактором. Автореферат и опубликованные работы достаточно полно отражают содержание диссертации.

Таким образом, полученные Д.О. Чернышевой научные результаты и выводы являются обоснованными и достоверными.

Замечания

Принципиальных замечаний к работе нет. Имеются некоторые замечания редакционного характера.

1. Стр. 40: ключевое уравнение (1) $\mu(x)=expR_0(\alpha x)$ приведено с опечатками. На самом деле уравнение Гомпертца имеет вид: $\mu(x) = R_0 \exp(\alpha x)$. При этом $\exp$, $\log$ и скобки пишутся прямым шрифтом, а знак равенства отделяется двумя пробелами.

2. Стр. 42: Fold change – это отношение, кратность. Поэтому в уравнении (5) скорей всего тоже опечатка. Должна быть не разность, а отношение $FC = R_{\text{exp}}/R_{\text{contr}}$. Разность может быть для логарифмов: $\log FC = \log R_{\text{exp}} - \log R_{\text{contr}}$. Кроме того, всякая формула должна сопровождаться списком обозначений введенных величин. Это правило нарушено в формулах 1, 3, 5. Например, нигде не сказано, что x – это возраст.

3. Подписи оси Y на рис. 29-44 двусмысленны: $\log_2 FC$ это не то же самое, что $\log_2 FC$. Правда, в тексте диссертации на стр. 43 указано, что «на гистограммах отображали показатель $\log_2 FC$ ». Однако в автореферате в примечаниях к табл. 1 без всяких пояснений снова читаем $\log_2 FC$.

4. Стр. 47: непонятно, почему α (параметр в уравнении Гомпертца) именуется «зависимой от возраста интенсивностью смертности». В принятой модели α - константа и от возраста не зависит.

5. Статистическая значимость (не надо использовать слово достоверность!) всюду представлена архаичным образом: $p < 0.05$, $p < 0,01$ и т.д. Современные компьютерные программы дают возможность приводить

точные значения p -values. К тому же подобная запись не позволяет читателю прикинуть поправку на множественность сравнений. А такая проблема в работе есть. Например, в случае индуцированных изменений экспрессии генов для каждого пола проводились, по меньшей мере, 168 тестов (21 ген $\times$ 8 вариантов генотоксического воздействия). В этой ситуации значимыми могут считаться лишь эффекты, для которых $p < 0.0003$.

6. Автор, регистрируя событие $|\log_2FC| = k > 1$, сообщает, что экспрессия изменилась в k раз. Стилистически это неправильно – нужно писать «в 2^k раз». Например, на стр. 77 (и всюду далее): «... у самцов выявлено снижение экспрессии гена *Drosomycin* в 2.14 раза после воздействия паров 7%-го раствора формальдегида ...». По рис. 29а видно, что -2.14 – это $\log_2FC$. Следовательно, экспрессия снизилась в $2^{2.14} = 4.4$ раза.

7. К предыдущему замечанию. В заголовке к табл. 12 (стр. 108) надо было указать, что речь идет о логарифме относительных изменений экспрессии. Иначе приходится гадать, как изменения в 1.01 раза оказываются значимыми. В комментариях к таблице дается фраза, которая окончательно запутывает читателя: «...указаны только достоверные значения изменений показателя $\log_2FC$ ». Показатели $\log_2FC$ не изменяются и между собой не сравниваются. Всякий раз проверяется нулевая гипотеза о том, что $FC = 1$.

И еще один комментарий дискуссионного характера. Фраза «показан стохастический характер воздействия малых доз формальдегида, толуола, ТХДД и ионизирующей радиации ...» (стр. 9) равносильна признанию, что никаких регулярных или воспроизводимых эффектов не обнаружено. Разнонаправленные эффекты наблюдались в различных повторностях, в рамках экспериментов «доза1-доза2» и в группах «самцы-самки». Рецензент полагает, что основной результат этой большой и кропотливой работы имеет негативный характер. По крайней мере, в отношении влияния изученных доз на плодовитость и продолжительность жизни. Напротив, индуцированные изменения экспрессии генов явно имеют регулярный характер. Оба

результата важны и заслуживают обсуждения с более четкой расстановкой акцентов.

Приведенные замечания не влияют на, безусловно, положительную оценку работы в целом.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Результаты проведенного исследования вносят вклад в общее представление о генетических основах адаптации биоценозов к неблагоприятным условиям окружающей среды. Проведенные исследования существенно развивают известные ранее подходы к биоконтролю природных популяций при антропогенных воздействиях и могут служить методической основой для экологического нормирования радиационного и химического воздействия на экосистемы. Предложенные молекулярные методы оценки стресс-ответа и адаптации организма будут востребованы в дальнейших эколого-генетических обследованиях загрязненных территорий.

Результаты работы могут быть использованы в образовательных целях на биологических факультетах ФГОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова», ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», в ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, ГУ Научный центр биомедицинских технологий, ГУ Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Чернышовой Дарьи Олеговны по теме «Возраст-зависимые изменения жизнеспособности и профиль экспрессии генов стресс-ответа *Drosophila melanogaster* при воздействии химических и физических стресс-факторов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для

экологии и генотоксикологии природных популяций. Работа Чернышевой Д.О. по актуальности изучаемой проблемы, научной новизне, практической значимости, полноте изложения и обоснованности выводов отвечает требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней и присвоения ученых званий» ВАК РФ, а автор заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология.

«26» декабря 2016 г.

Зав. лабораторией экологической генетики
ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
доктор биол. наук А.В. Рубанович
rubanovich@vigg.ru
Моб.: +7 916 123 6242

Подпись А.В. Рубановича заверяю:
ученый секретарь ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН
доктор биол. наук О.А. Огаркова