

Отзыв
Официального оппонента
На диссертацию
Евгении Владимировны Добровольской
«Воздействие факторов разной природы (гипертермии, голодания, окислительного стресса) на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* со сверхэкспрессией генов циркадных ритмов»,
представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биология).

Актуальность.

Диссертация Добровольской представляет собой дальнейшее развитие комплексного многолетнего исследования, проводимого в Институте Биологии Коми научного центра РАН, под руководством Алексея Александровича Москалева. В работе применён классический генетический подход – использование мутантных линий *Drosophila*. Поэтому знакомился я с этой работой с большим интересом.

С момента возникновения биосферы эволюция организмов шла в условиях целого набора ритмов. Самый очевидный из них – это суточный ритм освещения. При этом неизбежно должны были возникнуть механизмы «отслеживания» таких ритмов и, соответственно, механизмы регуляции на уровне организма. Наиболее известным механизмом «слежения» является суточный ритм концентрации мелатонина в тканях. Он обусловлен подавлением активности одного из ферментов пути биосинтеза мелатонина солнечным светом.

Известно, что систематическое нарушение светового режима ухудшает способность организма к стресс-ответу и приводит к снижению продолжительности жизни у экспериментальных животных. Искусственное увеличение длины светового дня или интенсивности света вызывает нарушение циклов сна и бодрствования и увеличивает риск развития онкологических заболеваний. В результате даже появился термин «световое загрязнение» антропогенное по своей природе.

Поэтому диссертацию с такой темой можно было представлять как в диссертационный совет по генетике, так и по экологии. Это означает, что исследование относится к интенсивно развивающейся науке – экологической генетике, и его актуальность не вызывает сомнений.

Регуляцию ритмов на уровне организма осуществляют гены циркадных ритмов. Их включение/выключение, изменение времени и места экспрессии теоретически должно оказывать влияние на жизнеспособность организма и, соответственно, на процессы старения.

Моделирование последствий таких изменений можно успешно проводить на лабораторном объекте “*Drosophila melanogaster*”, что и было предпринято в данном исследовании.

Новизна

В работе впервые проведено комплексное исследование влияния изменений в экспрессии генов циркадных ритмов на устойчивость к стрессорным воздействиям у лабораторного объекта – *Drosophila melanogaster*.

Практическая значимость

Проведенное исследование вносит существенный вклад в понимание генетических механизмов, определяющих устойчивость к стрессорным воздействиям внешней среды, оксидативному стрессу, голоданию. Полученные автором результаты могут быть в дальнейшем разработаны подходы к терапии нарушений биоритмов у человека.

Основное содержание

Диссертация состоит из введения, четырёх глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов), выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 273 источника, в том числе 237 публикаций из зарубежных изданий. Работа изложена на 137 страницах машинописного текста и содержит 12 таблиц и 22 рисунка.

Особо отмечу, что автором в самом начале сформулирована рабочая гипотеза, которая звучит так: “Мы предположили, что индукция экспрессии генов циркадных ритмов (*cryptochrome, period, Clock, cycle, timeless*) на фоне ограничительной диеты у особей *Drosophila melanogaster* компенсирует возраст-зависимое снижение активности исследуемых генов и повысит устойчивость к стресс-факторам”

Появление рабочей гипотезы в самом начале текста сильно облегчает задачу оппонента, поскольку сразу становится понятно, исходя из чего надо оценивать адекватность применённых методов и соответствие выводов полученным результатам.

Особенно хочется отметить строгий научный стиль, в котором выдержан текст. Мне удалось обнаружить только два англицизма «кондиционная» сверхэкспрессия и «экспрессия белков».

В работе использован обширный набор современных методов анализа стрессустойчивости, динамики экспрессии генов и др. Отмечу, что среди применённых методов статистического анализа впервые в работе, выходящей из лаборатории, появляется метод регрессии Кокса. Что можно отнести, как к новизне, так и к достоинствам работы. Я предпочитаю второе.

Знакомство с описанием использованных линий (десять) и, особенно, источников их получения, показывает, что лаборатория поддерживает широкие международные контакты. Есть одно стилистическое замечание. Университет Орегона – это, очевидно Oregon State University? Тогда это университет штата Орегон. А Syktyvkar State University – это Сыктывкарский Государственный университет.

Есть сомнение в адекватности метода «ограничительной диеты». В своё время Лучникова и Савицкий изучали последствия содержания дрозофил на дрожжах с изменённым составом стерина. Известно, что имаго едят в основном дрожжи. Поэтому на поверхности их тела дрожжей довольно много и эти дрожжи имеют склонность размножаться. Лучникова и Савицкий

применяли процедуру «стерилизации» мух, окуная их на короткое время в формальдегид. В рецензируемом исследовании мелкий бес (bias) в виде «привнесенных» дрожжей вполне мог повлиять на результаты.

При анализе работы в целом возникает один «глобальный вопрос». Автор высказывает предположение «Возможно, сверхактивируя какой-либо один из исследуемых генов в изучаемой ткани, мы нарушаем баланс между элементами молекулярного осциллятора, что приводит к отрицательным эффектам».

С другой стороны, в выводе 5 автор заключает, что: «Результаты корреляционного анализа и регрессии Кокса показывают, что ограничительная диета уменьшила выраженность негативного влияния нарушения работы генов циркадных ритмов на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*».

Так что следует относить к нарушениям? Сверхактивацию генов циркадных ритмов? Или последствия этой сверхактивации?

В обзоре литературы диссертации на «геронтологическую» тему неизбежно должен появиться «лимит Хейфлика». Он и появляется на стр. 13.

Автор пишет, что: «Большинство исследователей считают, что лимит Хейфлика является проявлением механизма, возникшего у многоклеточных организмов для подавления опухолеобразования, и лишь побочно является причиной старения» (ссылка на работы 2007 года). В очередной раз хочу реабилитировать Хейфлика и сказать, что он ещё в середине 80-х годов прошлого века заявил, что теломерный репликометр детерминирует продолжительность жизни, а не «старение на клеточном уровне».

В разделе 1.2.3. автор пишет об ионизирующих излучениях и о репарации возникающих повреждений в ДНК. Завершается раздел утверждением о том, что ионизирующие излучения подавляют выработку мелатонина. Ссылки нет. Поэтому возникают вопросы. Только мелатонина? Это такой важный гормон?

Неясно, как получены результаты, описанные в таблице 5. Третья строчка, самцы *Cry*⁰¹. После 72 часового голодания остаётся в живых 1,4% живых особей. И у них медиана выживания 60 суток?

В подписи к рисунку 6 (возрастная динамика суточной активности) в тексте диссертации отсутствует разъяснение, что именно на нем изображено. Пришлось обращаться к автореферату. В нем такое разъяснение есть.

В тексте есть еще ряд других мелких недочётов, но на них я подробно останавливаться не буду.

Глава 4 «обсуждение результатов» также написана хорошим научным стилем. Но есть несколько соображений.

На странице 32 автор пишет: «Сверхактивация гена *Clk* в нервной системе у самцов дрозофилы увеличила резистентность к действию данных факторов. Ранее показано, что мыши с индуцированной недостаточностью экспрессии *Clk* имеют низкую активность теломеразы». Считаю появление такого абзаца неуместным, поскольку у дрозофилы теломеразы нет.

Стр. 103. «У самок дрозофилы сверхактивация гена *per* в нервной системе и жировом теле вызвала увеличение медианной продолжительности жизни. Как известно, гены *PER* являются потенциальными супрессорами опухолевого роста. ... полученные результаты подтверждены на мышах....».

Возникновение опухолей – прерогатива пролиферирующих тканей. А дрозофила – постмитотический организм. Полагаю, что не следует обсуждая результаты, полученные на дрозофиле, сопоставлять их с результатами, полученными на мышах. Если уж искать параллели, то лучше с нематодой – тоже постмитотическим организмом.

Заключение

Говоря о работе в целом, следует заключить следующее.

Автором проведено тщательное исследование влияния изменений активности генов циркадных ритмов на важный компонент общей приспособленности (продолжительность жизни) у *Drosophila melanogaster*.

Рабочая гипотеза получила подтверждение.

Показано негативное влияние мутации в гене *cryptochrome* на продолжительность жизни имаго в стандартных условиях и при введении ограничительной диеты.

Выявлены изменения экспрессии генов циркадных ритмов у имаго исходной линии при старении.

Установлено влияние ограничительной диеты на последствия сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в периферических тканях.

Применённые методы адекватны, результаты тщательно и грамотно проанализированы. Выводы соответствуют полученным результатам. Автореферат диссертации полностью отражает её содержание.

Результаты прошли апробацию на нескольких конференциях, отражены в пяти публикациях в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. На момент написания отзыва число цитирований работ автора в системе РИНЦ – 7, а если осуществить привязку, непривязанного будет 18. Индекс Хирша – 2, а если осуществить привязку, будет 3. Что говорит о том, что полученные результаты признаны научным сообществом.

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

Заданные вопросы и сделанные замечания не снижают общего благоприятного впечатления от знакомства с текстом диссертации.

Таким образом, диссертационная работа Евгении Владимировны Добровольской «Воздействие факторов разной природы (гипертермии, голодания, окислительного стресса) на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* со сверхэкспрессией генов циркадных ритмов» является законченным исследованием в рамках поставленной задачи.

Работа соответствует основным критериям пп. 9-14 Постановления Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 №842, «Положения о порядке присуждения учёных степеней» (в редакции с изменениями, утверждёнными Постановлением Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 355), а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биология).

Кандидат биологических наук, доцент.
Доцент кафедры генетики и биотехнологии
Санкт-Петербургского государственного
университета, 199034, г. Санкт-Петербург,
Университетская наб. 7/9 Т. 812 3636105
E-mail: s.mylnikov@spbu.ru

Сергей Владимирович
Мыльников
31/03/17