

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

о диссертационной работе Демидовой Елизаветы Вячеславовны на тему «**Изучение воздействия терагерцового излучения на *Escherichia coli* при помощи геносенсоров**», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности **03.02.07 – генетика**

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

Диссертационная работа Демидовой Е. В. посвящена изучению воздействия терагерцового (ТГц) излучения на бактерии *E. coli*. К ТГц диапазону принято относить частоты от 0,1 до 10 ТГц, что соответствует длинам волн 30 - 300 мкм. Это неионизирующее излучение, которое при прохождении сквозь мутные среды рассеивается значительно меньше, чем излучение видимого и ИК диапазона, в достаточной степени проникает сквозь кожу человека, хорошо проникаемо для ряда упаковочных материалов. В последнее время ведутся интенсивные работы по созданию новых портативных источников и детекторов данного излучения. В настоящее время ТГц излучение применяется в системах безопасности, неразрушающего контроля на производстве, ведутся работы по применению данного излучения в системах связи, диагностике ряда заболеваний, в том числе онкологических, разрабатываются методы неинвазивного определения глюкозы в крови. Все это свидетельствует о перспективе широкого использования ТГц излучения во многих сферах человеческой деятельности. Однако на сегодняшний день нет достаточных сведений о последствиях влияния данного излучения на биологические объекты, не установлены границы биологически безопасных доз облучения при работе с данным типом излучения.

В настоящий момент нет однозначного мнения о механизмах влияния ТГц излучения на биологические объекты. Ряд исследователей считают, что в основе всех наблюдаемых эффектов ТГц излучения лежит повышение температуры объектов при облучении, так называемые «тепловые» эффекты. Однако, многочисленные данные, в том числе и теоретические расчеты, свидетельствуют о том, что в основе взаимодействия ТГц излучения с биологическими объектами лежат иные, более сложные, чем «тепловые» эффекты, механизмы. Цель представляемой работы состояла в изучении именно нетермического воздействия ТГц излучения. Автором реализован оригинальный подход к исследованию данного вопроса – в качестве модельного объекта выбраны бактерии *E. coli*, содержащие плазмиды с репортерным белком, который находится под регуляторным контролем гена из стрессовой системы бактерии. Такая культура клеток является геносенсором, демонстрирующим реакцию определенной стрессовой системы клетки на

то или иное воздействие синтезом флюоресцентного белка, в данном исследовании - green fluorescent protein, GFP. Использование геносенсорных конструкций является доступным и удобным способом, позволяющим выявить влияние ТГц излучения на функционирование генетических систем *E. coli* и предположить некоторые механизмы этого влияния. Такой подход для исследования эффектов ТГц излучения ранее не использовался.

Таким образом, диссертационная работа Демидовой Е.В. является весьма актуальной и единственной в своем роде, задачи исследования полностью соответствуют заявленной цели, а используемые методы адекватны.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Научная новизна представленной работы не вызывает сомнения. В работе были сконструированы оригинальные геносенсоры *E. coli*/pCopA-GFP и *E. coli*/pGlnA-GFP, с помощью которых впервые было показано, что промоторы генов *copA* и *glnA* задействованы в ответе на нетермическое воздействие ТГц излучения лазера на свободных электронах. Впервые показана индукция промотора гена *katG* геносенсора *E. coli*/pKatG-GFP в ответ на ТГц излучение, что свидетельствует об активизации системы окислительного стресса.

Автором впервые продемонстрировано влияние облученной водной среды на развитие биологических эффектов ТГц излучения. Впервые показано, что клетки геносенсоров *E. coli*/pKatG-GFP, *E. coli*/pCopA-GFP и *E. coli*/pGlnA-GFP, помещенные в облученную минимальную среду М9, демонстрируют ту же динамику синтеза репортерного белка GFP, что и жидкие культуры геносенсоров, непосредственно облученные ТГц излучением.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты диссертационной работы Демидовой Е.В. важны для понимания механизмов взаимодействия ТГц излучения с биологическими объектами. В работе были впервые получены экспериментальные доказательства селективности нетермического воздействия ТГц излучения на стресс-реактивные системы *E. coli*. В работе были исследованы системы окислительного стресса (геносенсор на основе промотора гена *katG*, естественный индуктор для этой системы перекись водорода), гомеостаза ионов меди

(геносенсор на основе промотора гена *copA*, естественный индуктор для этой системы сульфат меди), система эффлюкса антибиотиков (геносенсор на основе промотора гена *emrR*, естественный индуктор для этой системы салициловая кислота). Кроме того, исследовали реакцию геносенсора на основе промотора гена *glnA*, задействованного в метаболизме аминокислот. Был показан разный уровень ответа стресс-реактивных систем *E. coli* на естественные индукторы, повышение температуры и ТГц излучение и предложена гипотетическая схема влияния транскрипционного фактора FruR на регуляцию генов *katG*, *copA* и *glnA*, что может иметь большое теоретическое и практическое значение при анализе эффектов ТГц излучения и прогнозирования возможных последствий его использования.

В работе было впервые показано и последовательно изучено влияние ТГц излучения на водные среды. Было показано, что облучение культуральной среды М9 вызывает образование устойчивого фактора индукции системы гомеостаза ионов меди и окислительного стресса у *E. coli* и этот фактор связан с органическими компонентами среды. Данный результат имеет большое значение для понимания механизмов взаимодействия ТГц излучения с биологическими объектами.

Результаты диссертации могут быть использованы в различных научно-исследовательских институтах, преимущественно молекулярно-биологического и биофизического профилей как в России, так и за рубежом, могут служить основой для разработки методов по установлению границы биологически безопасных доз облучения при работе с ТГц излучением.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И ОБОСНОВАННОСТИ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Автором были самостоятельно получены геносенсоры *E. coli*/pCopA-GFP и *E. coli*/pGlnA-GFP, проведена большая часть экспериментальной работы. Исследования были проведены с использованием современных молекулярных и цитогенетических методик. Особенно следует отметить технику проведения экспериментов по облучению биологических образцов. Эксперименты были проведены в специально сконструированной кювете при постоянном контроле температуры, что особенно важно при исследовании нетермического воздействия ТГц излучения. Для достоверности полученных результатов использовали несколько видов контроля – положительный контроль, который представлял собой реакцию геносенсора на естественный индуктор и отрицательный контроль – клетки геносенсора, которые не подвергались какому-либо

воздействию. Автором была проведена масштабная работа по облучению ТГц излучением геносенсоров с последующим наблюдением и анализом флюоресцентного ответа. Было проведено всестороннее комплексное исследование, использованы адекватные методы статистического анализа полученных данных, поэтому достоверность и обоснованность полученных автором результатов не вызывает сомнения.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Представленная диссертация Демидовой Е. В. состоит из классических разделов: введение, четыре главы – обзор литературы; материалы, методы и приборная база; результаты; обсуждение; а также заключение, выводы и приложение. Работа изложена на 173 страницах, содержит 43 рисунка и 8 таблиц. Список цитированной литературы включает 228 источника, 48 из них опубликованы в отечественных изданиях.

В обзоре литературы автором дается представление о ТГц излучении, методах генерации и детектировании данного излучения как с использованием лазеров на свободных электронах, так и другими технологиями, приведены примеры использования ТГц излучения для диагностики и лечения ряда заболеваний человека. Автор дает подробный обзор по проблеме влияния миллиметрового и субмиллиметрового излучения на биологические объекты разного уровня организации, приводит основные теоретические концепции, касающиеся механизмов влияния данного типа излучения на живые объекты. Затем автор дает подробную характеристику объекту исследования - бактерий *E. coli*. Автор дает представление о существующих репортерных системах на основе бактерий *E. coli*. Также автор подробно описывает стрессовые и метаболические генетические системы *E. coli*, на ключевых регуляторных элементах которых базируются геносенсоры, использованные в работе. Этот раздел обзора почти в два раза по объему превышает предыдущие части, написан хорошим языком, понятно и достаточно подробно. В конце обзора дается заключение, в котором кратко и понятно резюмируется актуальность представляемого исследования.

В главе Материалы, методы и приборная база четко и логично описаны подходы, с помощью которых были поставлены эксперименты по экспонированию биологических образцов культур геносенсоров. Значительное внимание уделено контролю температуры облученного образца с целью выявления именно нетермических эффектов излучения. Температура во время экспериментов контролировалась при помощи обтюлятора и тепловизора и находилась на уровне $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Также геносенсоры были дополнительно протестированы на возможность активации флюоресцентного белка при

повышении температуры до 42°C. Было показано, что данное воздействие не вызывает активации геносенсоров.

В работе дано подробное описание получения плазмидных геносенсорных конструкций на основе промоторов генов *copA* и *glnA* с использованием методов генной инженерии.

Статистическая обработка результатов включает в себя расчет стандартного отклонения (по трем независимым экспериментам) и метод линейной регрессии, который был использован для выявления эффектов влияния ТГц излучения на биологические образцы.

В главе **Результаты** приведено достаточное для понимания количество иллюстраций, демонстрирующих развитие флуоресцентного ответа геносенсоров после экспериментов. Первоначально для геносенсоров были определены оптимальные концентрации естественных индукторов. В экспериментах по облучению сначала облучали непосредственно клеточные культуры геносенсоров, при этом обязательным условием являлось одновременное тестирование облученных образцов, образцов отрицательного контроля (без каких-либо воздействий) и положительного контроля (воздействие естественным индуктором). Было показано, что промоторы генов *copA* и *katG* задействованы в ответе на нетермическое воздействие ТГц излучения, а промотор гена *emrR* нет. При помощи геносенсора на основе промотора гена *katG* показана дозовая зависимость. Для понимания полученных результатов важным является исследование, проведенное относительно количества клеток опыта и отрицательного контроля в течение измерения флуоресценции. Отсутствие значимой разницы свидетельствует о том, что причиной увеличения флуоресценции является исключительно продукция флуоресцентного белка, а не количество клеток геносенсоров. Еще один геносенсор – на основе промотора гена *gln*, который отвечает за биосинтез аминокислот, – был сконструирован на базе ранее полученных данных по протеомному анализу облученных образцов в Лаборатории молекулярных биотехнологий.

Проведено сравнение интенсивности ответной реакции геносенсоров и показано, что именно геносенсор на основе промотора гена *katG* имеет наибольшую интенсивность флуоресцентного ответа в результате нетермического воздействия ТГц излучения. Далее было показано, что помещение клеток геносенсоров в отдельно облученную минимальную культуральную среду М9 тоже вызывает развитие флуоресцентного ответа, аналогичного непосредственному облучению клеточной культуры. Экспериментально показано, что модификация облученной среды является достаточно устойчивой и связана с ее органическими компонентами – глюкозой или казаминовыми кислотами.

Глава **Обсуждение результатов и Заключение** написаны понятно, позволяют проследить всю логику исследования, связь с предварительными работами, выполненными в мире и в лаборатории, высказаны некоторые гипотетические предположения относительно механизмов воздействия ТГц на бактерии. Так, первоначально тестировался геносенсор, чувствительный к окислительному стрессу. Его выбор был обоснован возможным воздействием ТГц излучения на водородные связи, что может привести к сдвигу окислительно-восстановительного равновесия в клетке. С другой стороны, геносенсор на основе гена *copA*, участвующий в гомеостазе ионов меди, тоже чувствителен к воздействию ТГц излучения. Автор выстраивает ряд активности геносенсоров по их реакции на ТГц излучение: одной из первых на нетермическое воздействие ТГц излучения реагирует система, контролирующая биосинтез аминокислот, параллельно или с небольшим отставанием реагирует система поддержания гомеостаза меди и, наконец, система, контролирующая окислительный стресс у клеток *E. coli*. При этом наиболее выраженная реакция наблюдается именно у последней из упомянутых систем. Автором сделана попытка связать эти системы через глобальный транскрипционный фактор FruR, участвующий в метаболизме сахаров. Интересными являются результаты, связанные с тем, что облученная минимальная среда также может индуцировать флуоресцентный ответ в геносенсорах, при этом некий фактор индукции связан с органической составляющей минимальной среды. Автором сделаны предположения о первичном механизме взаимодействия ТГц излучения с биологическими объектами, опираясь на теории Фрёлиха и Девяткова.

Приведенное заключение позволяет еще раз оценить важность экспериментов по результатам которых формулируются **Выводы**. Автором сформулированы 5 выводов, которые логически и аргументировано вытекают из анализа результатов выполненного научного исследования.

Материалы диссертационного исследования были представлены и обсуждены на российских и международных конференциях, в том числе: «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012), «Terahertz and Microwave radiation: Generation, Detection and Applications» (Москва, 2012), 2nd International THz-Bio Workshop (Сеул, Корея, 2011), XIX национальная конференция по использованию синхротронного излучения. Всероссийская молодежная конференция «Использование синхротронного излучения» (Новосибирск, 2012). По результатам диссертации опубликованы 2 научные статьи в рецензируемых высокорейтинговых журналах, входящих в международную базу данных Web of Science. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Принципиальных замечаний по содержанию работу нет. Однако есть мелкие замечания и пожелания:

1. По тексту диссертации встречаются опечатки, пропуски слов, использование профессионального “жаргона”. Так, на стр. 20 в тексте диссертации опечатки в написании диапазона частот (ГГц и ТГц), пропущено слово “частоты”; на стр. 20 и 21 не правильно указаны дозы облучения (Вт/см^2); в тексте диссертации нет ссылки на рис.11; название рис. 29 в тексте диссертации и в подписи к рисунку не совпадают и т.д.

2. В автореферате, на мой взгляд, не достаточно хорошо представлена актуальность темы диссертационного исследования. В главе “Обзор литературы” есть для этого вся необходимая, логично и последовательно изложенная информация.

3. В автореферате отсутствует пункт “Апробация работы”, хотя в тексте диссертации такой пункт есть.

4. В качестве пожелания: теория Фрёлиха требует более аккуратного трактования. Концепция Фрёлиха была предложена для объяснения нетепловых эффектов микроволн в 70-е годы прошлого столетия и связана с более сложными физическими процессами, которые возникают в биологических системах при поглощении нетеплового кванта ТГц излучения, чем только появление резонансных эффектов.

Указанные не принципиальные недостатки, допущенные автором при написании текста диссертации и автореферата, не повлияли на общее хорошее впечатление о данной работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Демидовой Е. В. является законченной научно-исследовательской работой, выполненной на высоком методическом уровне. Полученные результаты являются новыми и фундаментальными и проясняют некоторые эффекты влияния нетермического ТГц излучения на биологические объекты. Обнаруженный в работе феномен модификации водной культуральной среды в результате облучения является основанием для тщательного исследования вопроса не только о санитарных нормах при работе с терагерцовым излучением, но и о безопасности материалов, подвергавшихся облучению. Выводы хорошо обоснованы и соответствуют поставленным в работе задачам. Автореферат логично отражает основное содержание диссертации. Материал диссертации соответствует указанной специальности.

Таким образом, диссертация Демидовой Е. В. «Изучение воздействия терагерцового излучения на *Escherichia coli* при помощи геносенсоров» по своей

актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК Министерства образования и науки РФ (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842), предъявляемых к кандидатским диссертациям, а автор заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Официальный оппонент

Черкасова Ольга Павловна

Доктор биологических наук,

ведущий научный сотрудник

лаборатории биофизики

ФГБУН Институт лазерной физики СО РАН

630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 13/3

e-mail: o.p.cherkasova@gmail.com

тел.: 8(965)823-11-92

« 6 » июня 2016 г.

Подпись удостоверяю

Спец. по кадрам



О. П. Черкасова

Зулямова
06.06.16.