

**В Диссертационный совет Д 003.011.01
на базе Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской
академии наук»**

ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию Демидовой Елизаветы Вячеславовны «Изучение воздействия терагерцового излучения на *Escherichia coli* при помощи геносенсоров», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности 03.02.07 – «генетика».

Предметом исследования диссертационной работы Демидовой Елизаветы Вячеславовны является выявление и изучение влияния излучения терагерцового (ТГц) диапазона на бактерии *E. coli*. ТГц диапазон электромагнитного спектра начал осваиваться лишь в конце XX века. Бурное освоение этого диапазона и некоторые его свойства предполагают скорое внедрение в практику приборов с использованием ТГц излучения, что делает несомненно важным исследование как непосредственного его воздействия, так и возможных последствий такого воздействия в отношении биологических объектов. Данной проблеме посвящено достаточно много исследований (например, проект THz-BRIDGE), в которых часто можно наблюдать противоречивые результаты. Появление мощного источника – Лазера на свободных электронах (ЛСЭ), спроектированного и собранного на базе ИЯФ им. Будкера – позволяет проводить уникальные эксперименты с использованием ТГц излучения.

Диссертационная работа Демидовой Елизаветы Вячеславовны является актуальной и посвящена изучению нетермического воздействия ТГц излучения на функционирование генетических систем *E. coli* с использованием методов микробиологии и генетической инженерии. Цель и задачи данной работы сформулированы корректно и соответствуют теме диссертации. В качестве модельного объекта в проведенном исследовании автор

выбрал бактерии *E. coli*, генетика и молекулярная биология которых подробно изучены. На основе регуляторных участков некоторых бактериальных генов были созданы геносенсорные плазмидные конструкции. Бактериальные клетки после трансформации такими плазмидами (или геносенсоры) приобретали способность сигнализировать о наличии или отсутствии реакции конкретной стрессовой системы на ТГц излучение у *E. coli* синтезом специального репортерного белка GFP.

Диссертационная работа изложена на 173 страницах, содержит 43 рисунка и 8 таблиц. Состоит из введения, четырех глав основной части, заключения, выводов, двух приложений и списка использованной литературы, включающего 228 источников.

Глава 1 содержит литературный обзор по теме диссертации, который дает достаточно полную картину как о ТГц и других неионизирующих излучениях в свете их возможного влияния на биообъекты разного уровня организации, так и о стрессовых и метаболических системах бактерий *E. coli*, которые соотносятся с использованными в исследовании геносенсорами, а именно – системы окислительного стресса (геносенсор на основе промотора гена *katG*), гомеостаза ионов меди (геносенсор на основе промотора гена *sopA*), системы детоксикации антибиотиков (геносенсор на основе промотора гена *emrR*), положения глутамин синтетазы в регуляторных контурах *E. coli* (геносенсор на основе промотора гена *glnA*).

В главе 2 описаны материалы, методы и приборная база. Раздел методы включает описание процедуры создания геносенсорных плазмидных конструкций на основе промоторов *sopA* и *glnA* (геносенсоры на основе промоторов *katG* и *emrR* предоставлены другими лабораториями), подготовку культур для облучения на ЛСЭ и сам процесс облучения. В разделе, посвященном приборной базе, описан как источник излучения, так и рабочая станция, при этом особое внимание в постановке экспериментов уделено именно нетермическому эффекту терагерцового излучения на клеточную культуру. Температура в ходе облучения тщательно контролировалась при помощи тепловизора и обтюлятора. Также в этой главе описана статистическая обработка результатов, для некоторых экспериментов рассчитывалось стандартное отклонение, для других, преимущественно с геносенсором на основе промотора гена *katG* – линейная регрессия с использованием программного пакета OriginPro 7.5. Глава написана понятным языком.

В главе 3, результаты, приведены экспериментальные данные, представляющие собой изменение динамики флюоресценции культур геносенсоров в результате различных воздействий. Следует отметить, что в экспериментах по облучению всегда присутствовала культура без каких-либо воздействий, положительный контроль (исключение – геносенсор

на основе промотора гена *glnA*) и опыт – облученная культура. В качестве положительного контроля выступал естественный индуктор, специфичный для соответствующей стрессовой системы, а именно перекись водорода – для геносенсора на основе промотора гена *katG*, сульфат меди – для геносенсора на основе промотора гена *copA* и салициловая кислота – для геносенсора на основе промотора гена *emrR*. Приведенные результаты демонстрируют сходную динамику развития флюоресцентного сигнала у образцов отрицательного, положительного контроля и опыта после однократного облучения.

Проведенные эксперименты демонстрируют, что геносенсоры, содержащие регуляторные районы генов *copA*, *glnA* и *katG* скорее всего задействованы в ответе на нетермическое воздействие ТГц излучения, в то время как регуляторный элемент гена *emrR* не показал явного ответа. Было показано, что кинетика флюоресцентного ответа при облучении с различными длинами волн, а именно 130,150 и 200 мкм не имеет принципиальных отличий. Также был продемонстрирован пороговый эффект – индукции флюоресцентного ответа при облучении культуры в течение 5 минут не наблюдалось никогда. Был проведен эксперимент с высеванием культуры образцов опыта и отрицательного контроля в начале замеров флюоресценции и в конце. Отсутствие значимой разницы в количестве клеток подтвердило, что увеличение флюоресценции связано исключительно с продолжающимся синтезом GFP. Впервые обнаружен удивительный эффект воздействия ТГц излучения на жидкую культуральную среду. После облучения среда вызывала устойчивую индукцию системы гомеостаза ионов металлов и окислительного стресса у *E. coli*. Установлено, что для проявления индуцирующих свойств необходимо наличие некоторых органических компонентов в минимальной культуральной среде.

В главе 4, обсуждение, пояснена логика проведенных экспериментов и высказаны некоторые предположения относительно механизмов воздействия ТГц излучения на бактериальные клетки. Создание геносенсора на основе промотора гена *copA* и его тестирование обосновано тем, что в условиях окислительного стресса повышается чувствительность к ионам меди, которые становятся особо токсичными. Полученные результаты, демонстрирующие индукцию синтеза GFP после облучения, подтвердили это предположение. Геносенсор на основе промотора гена *glnA* был создан на основании данных протеомного анализа быстрого ответа на воздействие ТГц облучения, полученных в Лаборатории молекулярных биотехнологий. Индукция флюоресцентного ответа у этого геносенсора подтверждает задействованность гена *glnA* в ответной реакции на облучение на уровне транскрипции.

Следует отметить, что статистическая обработка результатов являлась сложным вопросом, т.к. из-за гетерогенности культуры геносенсоров, элиминации плазмиды и подтекания промоторов биологические повторы сложно было сравнивать между собой, особенно это касается геносенсора на основе промотора *katG*, который, тем не менее, демонстрирует наиболее выраженный флюоресцентный ответ на облучение. Именно поэтому в ряде экспериментов для статистической обработки был использован метод линейной регрессии.

Совокупность представленных данных свидетельствует не только об избирательности воздействия, т.к. геносенсор на основе промотора гена *emrR* не демонстрировал увеличение флюоресценции, но и о разном уровне реакции геносенсоров.

Дальнейшие эксперименты были посвящены исследованию вопроса целевого воздействия ТГц излучения. Исходя из гипотез Фройлиха и Девяткова, предполагавших воздействие на макромолекулы, было проведено отделение облученных клеток от минимальной культуральной среды, а также среда была облучена отдельно. Все полученные результаты являются новыми. В данной работе впервые показано, что воздействие ТГц излучения на жидкую культуральную среду вызывает образование устойчивого фактора индукции системы гомеостаза ионов металлов и окислительного стресса у *E. coli*. Установлено, что для формирования индуцирующего фактора необходимо наличие некоторых органических компонентов в минимальной культуральной среде. Таким образом, полученные данные дополняют гипотезу Фройлиха.

Замечания

Использование геносенсоров для изучения влияния терагерцового излучения и обнаружение индуктивных свойств культуральных сред несомненно является очевидной заслугой автора. Однако, при планировании и выполнении экспериментов Демидовой Е.В. на мой взгляд не до конца было учтено возможное влияние используемых соединений (перекись, медь, излучение и тд) на свойства РНК, белка и флюорохромной структуры репортера. Изменение рН или концентрации ионов меди напрямую влияет на флюоресценцию GFP, возможно, может влиять на время жизни белка или РНК, давая определенный вклад в полученные результаты. Таким образом, для более аккуратной оценки влияния терагерцового излучения и химических веществ на флюоресценцию предпочтительно было ввести еще один контроль, который позволил бы сравнить эксперименты с различными генетическими элементами, а именно, использовать тот же ген GFP под убиквитарным промотором, например, CMV. Использование такого контроля для изучения облученных сред позволило бы точнее определить особенности влияния

облученных сред на детектируемую флуоресценцию и получить дополнительные интересные результаты. Однако, это замечание не влияет на полученные результаты и положительную оценку работы.

Теоретическое и практическое значение

Полученные результаты способствуют лучшему пониманию эффектов воздействия нетермического ТГц излучения на биологические объекты и являются основой для тщательного тестирования внедряемых на основе ТГц излучения приборов и разработки соответствующих санитарных норм облучения, поскольку в инспекционных системах безопасности и при работе с диагностическим медицинским оборудованием возможно влияние излучения на клетки кожи и кровь. Обнаруженное в работе нетермическое влияние ТГц излучения на органические вещества в жидкой культуральной среде, в перспективе предполагает проработку вопроса не только о нормах при непосредственном воздействии излучения на биообъекты, но и о безопасности материалов, подвергавшихся облучению.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты работы являются фундаментальными и могут быть использованы в большом числе институтов молекулярно-биологического, биофизического и биологического профилей как в России, так и за рубежом.

Оценка содержания диссертации

Диссертация Демидовой Елизаветы Вячеславовны является законченной научно-исследовательской работой, выполненной на высоких теоретическом и экспериментальном уровнях. Полученные результаты являются новыми, выводы обоснованными. Содержание диссертации должным образом отражено в автореферате и опубликованных работах. Материал диссертации соответствует указанной специальности.

Заключение

Диссертация Демидовой Е. В. «Изучение воздействия терагерцового излучения на *Escherichia coli* при помощи геносенсоров» удовлетворяет всем требованиям ВАК РФ,

предъявляемых к диссертациям и соответствует критериям п. 9 «Положения о порядке

присуждения ученых степеней», автор заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности Генетика – 03.02.07.

Официальный оппонент

Доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией
эпигенетики ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И.
Вавилова РАН»

С.Л. Киселев

119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д. 3, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
РАН

Kiselev@vigg.ru

Телефон:+79037490553

« 06 » 06 2016 г.

Подпись заверяю.

Зам. Директора ИОГен РАН

Д.б.н.



А.М. Кудрявцев