

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

**ИНСТИТУТ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ
БИОЛОГИИ**

СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИМКБ СО РАН)



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИМКБ СО РАН

академик И.Ф. Жимулев

«06» _____ июня _____ 2016 г.

пр. Академика Лаврентьева, д. 8/2, Новосибирск, 630090

телефон (383) 3639042, факс (383) 3639078

e-mail: info@mcb.nsc.ru

<http://www.mcb.nsc.ru>

ОКПО 30781167, ОГРН 1115476157070,

ИНН / КПП 5408291757 / 540801001

06.06.2016 № 15318 -

На № _____ от _____

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук на диссертационную работу **Демидовой Елизаветы Вячеславовны** «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. Диапазон терагерцовых (ТГц) волн располагается между микроволновой и инфракрасной частями электромагнитного спектра. Маломощными источниками этого излучения являются все нагретые тела. На Земле ТГц излучение интенсивно поглощается водой и ее парами в атмосфере, и поэтому у живых объектов отсутствует опыт непосредственного контакта с этим излучением. ТГц излучение характеризуется низкой энергией кванта, которой недостаточно для ионизации молекул. Таким образом, теоретически облучение ТГц волнами не должно вызывать у живых объектов последствий, характерных для облучения более высокоэнергетичными диапазонами электромагнитного спектра. В последние десятилетия ТГц диапазон частот электромагнитного спектра все более интенсивно используется в научных и особенно в

прикладных областях деятельности (например, в инспекционных системах безопасности и диагностическом медицинском оборудовании). Разработанные интенсивные источники этого излучения, такие как лазеры на свободных электронах (ЛСЭ), представляют уникальную возможность для изучения возможного воздействия ТГц излучения на живые объекты. При этом крайне существенно, что имеются технические возможности отделить потенциальные эффекты, вызванные собственно ТГц излучением, от температурных воздействий, неизбежно возникающих при диссипации энергии излучения в водных средах. В данной диссертационной работе проведено исследование воздействия ТГц излучения на клетки бактерии *Escherichia coli*, генетика, молекулярная биология и биохимия которой изучены очень детально. А именно, в представленной диссертационной работе изучена реакция ряда стрессовых систем бактерии на ТГц излучение посредством использования специфических геносенсорных конструкций, кодирующих зеленый флуоресцентный белок (GFP).

Проведенная Демидовой Е. В. работа, посвященная описанию динамики развития интенсивности флуоресценции белка GFP, кодируемого разными геносенсорами, в ответ на нетермическое воздействие ТГц излучения, безусловно, является актуальным и важным исследованием.

Научная новизна и значение работы. Ценность полученных результатов заключается в том, что впервые исследовано влияние нетермического воздействия ТГц излучения на стрессовые системы клеток *Escherichia coli*. В результате было установлено, что активность промоторных элементов следующих трех генов изменяется в ответ на ТГц облучение: (1) гена *katG*, который в норме индуцируется окислительным стрессом, (2) гена *copA*, который в норме индуцируется избытком ионов меди и (3) гена *glnA*, количество белкового продукта которого, согласно ранее полученным результатам протеомного профилирования, увеличивается в ответ на ТГц облучение. При этом не было обнаружено реакции промотора гена *emrR*, который в норме индуцируется противомикробными агентами, на

облучение ТГц волнами. Таким образом, впервые получены экспериментальные доказательства избирательности нетермического воздействия ТГц излучения на стрессовые системы клеток *Escherichia coli*. При помощи геносенсора, содержащего промотор гена *katG*, автором было обнаружено, что нетермическое воздействие ТГц излучения носит ярко выраженный дозовый характер. При помощи геносенсоров, содержащих промоторы генов *katG* и *copA*, было продемонстрировано, что характер динамики ответа на ТГц облучение принципиально отличается от характера динамики ответа на естественные индукторы. Кроме того, было установлено, что облучение жидкой культуральной среды М9 ТГц волнами вызывает образование в ней устойчивого фактора индукции промоторов генов *katG* и *copA*. Показано, что образование этого фактора связано с органическими компонентами среды. Все полученные результаты вносят вклад в развитие представлений о воздействии ТГц излучения на функционирование генетических систем у *Escherichia coli*.

Состав и структура диссертации. Диссертационная работа Демидовой Е. В. построена по традиционному плану и состоит из краткого введения, обзора литературы, описания материалов, методов и приборной базы, изложения полученных результатов, их обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы и приложений. Работа изложена на 173 страницах, включает 43 рисунка, 9 таблиц и список литературы, содержащий 228 источников.

Обзор литературы является тщательно выполненной частью диссертационной работы. Обзор литературы посвящен известным на сегодняшний день свойствам и способам генерации ТГц излучения, описанию принципа работы геносенсорных конструкций, а также стрессовым системам *Escherichia coli*, компоненты которых были использованы в работе. Этот обзор выгодно отличается тем, что в нем дано подробное описание генетических систем окислительного стресса, гомеостаза ионов металлов, формирования устойчивости к антибактериальным веществам и метаболизма

аминокислот. В целом обзор производит хорошее впечатление, дает исчерпывающую и ясную картину современного состояния проблемы и свидетельствует о компетентности и хорошей теоретической подготовке автора.

В разделе «Материалы, методы и приборная база» автор описывает использованные методы молекулярного клонирования, обработки клеток геносенсоров химическими веществами и ТГц излучением, а также способ измерения уровня флуоресценции клеток геносенсоров. Кроме того, подробно описаны использованные в работе уникальные приборы – источник ТГц излучения, специально разработанная кювета для экспонирования биологических образцов, а также система, позволяющая поддерживать температуру исследуемого объекта с погрешностью $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Данный раздел написан тщательно, представлены все стадии экспериментов. Все это дает основания считать описанные ниже результаты достоверными.

Автором получены интересные экспериментальные данные. Результаты исследований подробно и логично описаны, эксперименты хорошо проиллюстрированы. Работу можно разделить на три части. В первой, подготовительной части автором были сконструированы геносенсоры, содержащие промоторы генов *copA* и *glnA*, а также подобраны оптимальные концентрации естественных индукторов для геносенсоров, содержащих промоторы генов *katG*, *copA* и *emrR*. Для всех четырех геносенсоров, использованных в работе, было проведено сравнительное изучение индукции перекисью водорода (окислительный стресс), сульфатом меди и салициловой кислотой (противомикробный агент). Оказалось, что добавление в культуральную среду сульфата меди значительно увеличивает активность не только геносенсора, содержащего промотор гена *copA*, но и геносенсоров, содержащих промоторы генов *katG* и *glnA*. Необходимо отметить, что важным результатом диссертационной работы является то, что автор доказал отсутствие активации геносенсоров, содержащих промоторы генов *katG* и *copA*, после температурного воздействия (42°C , 15 минут). Во

второй части работы автор исследует влияние нетермического воздействия ТГц излучения на клетки геносенсоры четырех типов (с промоторами генов *katG*, *copA*, *emrR* и *glnA*). Для геносенсора, содержащего промотор гена *katG*, были проведены серии экспериментов с ТГц излучением с разной длиной волны (130, 150 и 200 мкм) и с разной продолжительностью облучения образцов (5, 10 и 15 минут). На основе полученных результатов автор делает вывод о том, что нетермическое воздействие ТГц излучения носит ярко выраженный дозовый характер. Для геносенсоров, содержащих промоторы генов *copA*, *emrR* и *glnA*, эксперименты были выполнены при длине волны 130 мкм и времени экспозиции 15 минут. Установлено, что только геносенсор, содержащий промотор гена *emrR*, не изменяет своей активности в ответ на нетермическое воздействие ТГц излучения. В третьей части работы автором была выполнена серия экспериментов, призванная установить локализацию индуцирующего фактора, образующегося при облучении бактериальной культуры ТГц волнами. Полученные результаты указывают на то, что образование этого фактора связано с органическими компонентами среды M9.

В обсуждении автор суммирует полученные данные и предлагает их объяснения. Однако, к сожалению, автор практически не обсуждает возможные способы повышения воспроизводимости результатов (в будущих экспериментах) по динамике флуоресцентного ответа у геносенсоров при биологических повторах.

Выводы в представленной диссертационной работе построены на достаточном экспериментальном материале и соответствуют поставленным задачам. Таким образом, стоит отметить, что представленные в диссертационной работе экспериментальные результаты достаточно убедительны. В совокупности полученные результаты показывают, что поставленная цель исследования достигнута.

Однако к оформлению диссертационной работы есть небольшие замечания.

Хотя в разделе «Введение» на стр. 11 указано, что работа содержит 8 таблиц, в разделе «Результаты» на стр. 105 приведена таблица 9, ссылка на которую в тексте отсутствует.

На стр. 67 (Глава 2; «Материалы, методы и приборная база») при описании электропорацию клеток *Escherichia coli*, уместнее было бы сослаться не на Главу 2, а на соответствующий раздел данной главы.

На стр. 68, 70 и 72 не указано, при какой длине волны определяли оптическую плотность (ОП) бактериальных культур.

Также встречаются отдельные неудачно построенные фразы и опечатки.

Все вышеперечисленные замечания в целом не снижают достоинства работы, а диссертационная работа заслуживает высокой оценки. Достоверность полученных результатов, а также обоснованность выводов работы сомнений не вызывает. Основные результаты работы опубликованы в открытой печати и представлены на международных конференциях.

Результаты работы Демидовой Е. В. имеют значительную научную ценность. Для использования полученных в работе результатов рекомендуется ознакомиться с материалами диссертации следующие организации: Институт молекулярной генетики РАН, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, а также Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Диссертация в целом написана грамотно, материалы изложены логично, автореферат содержит основные результаты, положения и выводы диссертации. По материалам диссертации опубликованы 2 статьи.

Заключение. Диссертация Демидовой Е. В. «Изучение воздействия терагерцового излучения на *Escherichia coli* при помощи геносенсоров», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-исследовательской работой, в которой

решаются задачи, имеющие существенное значение для молекулярной генетики и молекулярной биологии.

По актуальности, новизне, практической ценности результатов, объему, методическому уровню проведенных исследований работа Демидовой Е. В. полностью соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации, N 842 от 24.09.2013, предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сам автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Отзыв ведущей организации обсужден и утвержден на заседании семинара лаборатории хромосомной инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, протокол N 5 от 31 мая 2016 г.

Зав. лабораторией хромосомной инженерии

ИМКБ СО РАН,

д.б.н.

С.А. Демаков



Сведения о составителе отзыва: Демаков Сергей Александрович, доктор биологических наук по специальности 03.03.07 – генетика, зав. лабораторией хромосомной инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИМКБ СО РАН)

Адрес: Пр. ак. Лаврентьева 8/2, Новосибирск, 630090,

Тел. +7(383) 3639059, e-mail: demakov@mcb.nsc.ru

Сведения о лице, утвердившем отзыв: Жимулев Игорь Федорович, академик РАН, доктор биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика, директор ИМКБ СО РАН