

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук
Екатерины Александровны Никитиной
на диссертацию Маргариты Александровны Бобровских (Ереминой) на тему
«Влияние кратковременного теплового стресса на экспрессию генов
инсулинового сигнального каскада и углеводно-жировой обмен у *Drosophila
melanogaster*», представленную к защите на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика

Диссертационное исследование М.А. Бобровских (в девичестве Ереминой) посвящено исследованию взаимодействия звеньев сигнального каскада инсулина/инсулиноподобных факторов роста и гормонов, участвующих в нейроэндокринной стресс-реакции насекомых.

Актуальность работы. Для современной биологии крайне необходимо понимание универсальных механизмов, лежащих в основе адаптации животных к меняющимся условиям среды. Адаптация – фундаментальное свойство живой материи, многомерного, глубинного, еще не познанного уровня; непрерывный эволюционный поиск более совершенной структурно-функциональной организации в столкновении с окружающим миром. Познание столь многоликого и в то же время целостного явления требует нетривиальности подходов, что выгодно отличает представленную работу. Термин «стресс» в биологию впервые ввел Уолтер Кеннон, описывая им напряжение при биологическом нарушении гомеостаза в живом организме. Развивая его воззрения, Ганс Селье предложил ответ организма на внешние воздействия разделять на специфическую (локальную) и неспецифическую (стереотипную) составляющие. Последняя получила название «стресс-реакция» или «общий адаптационный синдром». Несмотря на обширную историю изучения данного вопроса, сущность этого феномена до настоящего момента не раскрыта в должной мере. Так, до сих пор остается невыясненным, какие именно из генов инсулинового каскада участвуют в ответе организма на стресс, и каковы особенности взаимодействия звеньев сигнального каскада инсулина/инсулиноподобных факторов роста (И/ИФР) и

гормонов, участвующих в нейроэндокринной стресс-реакции насекомых. Детальному исследованию этой актуальной проблемы и посвящена диссертационная работа М.А. Бобровских.

Поскольку реакция на стресс является ключевым механизмом формирования стратегий выживания организмов, изучение взаимодействия генов инсулинового сигнального каскада и гормонов, участвующих в нейроэндокринной стресс-реакции насекомых, предпринятое в рамках диссертационного исследования М.А. Бобровских, представляет сугубый интерес как для фундаментальной науки, так и для прикладных сельскохозяйственных и медико-биологических исследований.

Необходимо подчеркнуть важность и перспективность исследований автора, посвященных изучению углеводно-липидного метаболизма. Это представляется особенно востребованным в свете того, что для человека известно множество факторов, провоцирующих развитие сахарного диабета 2 типа, как генетических, так и экологических. Понимание механизмов их действия требует поиска адекватных животных моделей. Удобной моделью для изучения данного вопроса может служить дрозофила в силу высокой гомологии путей углеводно-жирового обмена у насекомых и млекопитающих.

Именно с использованием дрозофилы в качестве модельного объекта автором проведено комплексное исследование влияния кратковременного теплового стресса на локализацию и экспрессию ряда ключевых компонентов инсулинового каскада, углеводно-жировой метаболизм и пищевое поведение, а также оценена роль стресс-связанных гормонов и двух ключевых компонентов инсулинового сигнального каскада, инсулиноподобного пептида DILP6 и транскрипционного фактора dFOXO, в регуляции этих признаков.

Таким образом, изучение взаимодействия генов инсулинового сигнального каскада и гормонов, участвующих в нейроэндокринной стресс-реакции насекомых является **актуальным направлением**, исследование

которого позволит приблизиться к более глубокому пониманию фундаментальных механизмов адаптации.

Структура диссертации. Материал изложен ясно, диссертация хорошо структурирована и оформлена. Работа изложена на 118 страницах машинописного текста и имеет традиционную структуру: состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, изложения материалов и методов исследования, собственных результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 24 рисунками и 5 таблицами. Соотношение разделов в диссертации является сбалансированным по объему. Список литературы включает 178 источников, из них 15 отечественных и 163 зарубежных.

Во введении обоснована актуальность и степень разработанности темы исследования, четко и корректно сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, положения, выносимые на защиту, отражены методология и методы диссертационного исследования, личный вклад автора, степень достоверности и апробация результатов, публикации по теме диссертации, структура диссертации.

В «Обзоре литературы» приводится развернутая характеристика стресса и стресс-реакции. Подробно разбирается структура, функции инсулиноподобных пептидов и регуляция инсулинового сигнального каскада у дрозофилы. Большое внимание уделено возможностям использования *Drosophila melanogaster* в качестве модельного объекта для изучения метаболических нарушений. При чтении «Обзора литературы» становится очевидным, что автор обладает глубокими и обширными знаниями круга проблем и литературы по избранной тематике.

В главе «Материалы и методы» изложена общая характеристика использованных в работе линий дрозофилы, подробно описаны условия стрессирования, экспериментальное изменение уровня гормонов, методы исследования, в частности, молекулярные, иммуногистохимические и

биохимические методы, анализ капиллярного питания, а также методы статистической обработки результатов. Автором использован широкий арсенал современных методик, позволяющих сделать обоснованное заключение по исследуемой проблеме.

В главе «Результаты» приведены результаты собственных исследований и анализ полученных данных. Экспериментальный материал изложен детально и хорошо проиллюстрирован рисунками. Отдельно стоит отметить последовательное обоснованное построение главы. В начале экспериментальной части работы Маргарита Александровна проводит исследование возрастных изменений локализации инсулиноподобного рецептора у самок дрозофилы. Обнаружено, что количество данных рецепторов у молодых самок дрозофилы значительно выше, чем у зрелых особей.

Далее в ходе исследования диссертант анализирует возрастную динамику плодовитости самок дрозофилы, применяя при этом нетривиальную методику автоматического подсчета численности мух. Выявлено, что плодовитость *D. melanogaster* растет, начиная с 1 суток после вылета, и достигает максимума на 3 сутки и далее не меняется значительно. Эти данные создают аргументированную базу для использования в дальнейших исследованиях исключительно зрелых самок (начиная с 3-суточного возраста после вылета имаго).

Интересен раздел, посвященный влиянию теплового стресса на локализацию dFOXO, DILP2 и DILP3 у самок дрозофилы. Полученные диссертантом данные являются оригинальными и убедительно свидетельствуют об участии компонентов сигнального каскада И/ИФР – инсулиноподобного пептида DILP3, инсулиноподобного рецептора dInR и транскрипционного фактора dFOXO в ответе организма дрозофилы на тепловой стресс. В этой же логической парадигме лежит предпринятое автором изучение влияния мутаций генов инсулиноподобного пептида DILP6

(*dilp6⁴¹*) и транскрипционного фактора dFOXO (*foxo^{BG01018}*) на экспрессию генов *dilp6*, *dfoxo* и *dInR* в нормальных условиях и при тепловом стрессе.

Выявленное изменение экспрессии этих трех генов ставит перед Маргаритой Александровной закономерный вопрос - как такие изменения могут отражаться на содержании липидов и углеводов? И полученные ею результаты позволяют говорить об отсутствии влияния теплового стресса (вплоть до 2,5 часов) на уровень общих липидов у самок.

Понимание комплексности и взаимообусловленности метаболизма не позволяет автору остановиться на достигнутом, и она движется дальше по пути познания, исследуя характер влияния теплового стресса на содержание ключевых для метаболизма насекомых углеводов (трегалозы и глюкозы) у самок дрозофилы. Упорство исследователя вознаграждено - изменения в содержании глюкозы и трегалозы у дрозофилы проявляются уже через 30 минут после начала теплового воздействия.

Эти интригующие результаты побуждают Маргариту Александровну к поиску ответа на необходимо вытекающий вопрос - может ли изменение уровня циркулирующих сахаров при тепловом стрессе быть обусловлено изменениями в метаболическом поведении? С этой целью ею предпринято изучение динамики интенсивности капиллярного питания у самок *D. melanogaster* после теплового воздействия, показавшее, что различия в метаболическом поведении у дрозофилы после теплового шока наступают спустя 24 часа и сопровождаются снижением интенсивности питания.

Далее автор с присущей наблюдательностью и цепкостью научного мышления переосмысливает обнаруженное ранее изменение ответа генов каскада И/ИФР на тепловой стресс у мутантных линий *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}* и решает проверить, оказывают ли влияние эти мутации на содержание углеводов и общих липидов в нормальных условиях и при тепловом стрессе. Оказалось, что уровень общих липидов у самок обеих мутантных линий повышен по сравнению с контрольной линией. В то же время через сутки

после теплового стресса содержание липидов у контрольной линии w^{1118} снижается, а у линий с мутациями $dilp6^{41}$ и $foxo^{BG01018}$ – нет.

Выявленное в данной работе повышенное содержание липидов у самок мутантных линий может объясняться увеличенным потреблением корма по сравнению с самками контрольной линии w^{1118} . Это позволяет автору заключить, что нарушения в работе каскада И/ИФР, вызываемые мутациями $dilp6^{41}$ и $foxo^{BG01018}$, приводят к нарушениям пищевого поведения в нормальных условиях, однако не оказывают существенного эффекта на снижение интенсивности питания после стрессирующего воздействия.

И в качестве финального аккорда для установления, являются ли стресс-связанные гормоны посредниками в передаче стрессорного сигнала на сигнальный каскад И/ИФР, диссертант изучает влияние каждого из этих гормонов на содержание углеводов у самок *D. melanogaster*. Показаны разнонаправленные эффекты - дофамин обладает ингибирующим эффектом по отношению к углеводному обмену; кормление октопамином приводит к повышению уровня трегалозы, как в нормальных условиях, так и при тепловом стрессе; обработка ювенильным гормоном приводит к снижению уровней трегалозы и глюкозы в норме и при тепловом стрессе; напротив, кормление 20-гидроксиэкдизоном влечет за собой повышение уровней обоих углеводов, как в норме, так и при тепловом воздействии.

Особо следует подчеркнуть логическую взаимосвязь всех разделов исследования, четкую постановку задач экспериментов, вытекающих из полученных в предыдущих частях работы результатов, что свидетельствует о комплексном походе автора к изучаемой проблеме.

М.А. Бобровских выделена отдельная глава, посвященная обсуждению результатов, что, несомненно, украшает работу. На основании литературных данных и результатов собственных исследований автор приходит к заключению о принципиальном отличии регуляции инсулинового каскада при голодании и тепловом стрессе. Полученные данные свидетельствуют о наличии отрицательной обратной связи в инсулиновом сигнальном каскаде,

координирующей экспрессию инсулиноподобных пептидов, синтезируемых в инсулин-продуцирующих клетках и периферических тканях дрозофилы после окончания стрессирующего воздействия. Проведенное исследование метаболического поведения представляет особый интерес в свете современных представлений о том, что регуляция питания и гликемии является результатом сложного взаимодействия метаболических, гормональных и нервных сигналов. Анализ участия стресс-связанных гормонов в регуляции углеводно-жирового обмена, как в нормальных условиях, так и при тепловом воздействии, позволил существенно расширить представления о механизме нейроэндокринной стресс-реакции и представить подробную схему взаимодействия ее компонентов.

Все результаты, представленные на защиту, получены либо лично диссертантом, либо при его непосредственном участии, что подтверждается опубликованными 8 статьями в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК, и апробацией результатов на международных и российских конференциях. **Выводы** работы полностью обоснованы полученными результатами исследования.

Представленное М.А. Бобровских диссертационное исследование, несомненно, обладает **научной новизной**, демонстрируя вклад ключевых генов инсулинового сигнального каскада в регуляцию углеводно-жирового метаболизма при развитии нейроэндокринной стресс-реакции у дрозофилы. Осуществлено комплексное исследование влияния теплового стресса на локализацию и экспрессию ряда компонентов инсулинового каскада *D. melanogaster*. Получены новые данные о влиянии мутаций генов инсулинового сигнального каскада, *dilp6* и *dfoxo*, на пищевое поведение, содержание углеводов и липидов у самок *D. melanogaster* в нормальных условиях и при кратковременном тепловом стрессе. Изучено влияние ряда стресс-связанных гормонов насекомых на изменение уровня углеводов у самок дрозофилы. Полученные результаты позволяют оценить роль

исследованных генов в стресс-реакции насекомых и установить систему взаимодействия ее элементов.

Теоретическая и практическая значимость работы определяется полученными сведениями о взаимодействии стресс-связанных гормонов и двух ключевых компонентов инсулинового сигнального каскада, являющихся безусловно значимыми для понимания механизмов адаптации. Настоящее исследование может послужить теоретической базой для прикладных работ в области сельскохозяйственной, лесной и медицинской энтомологии, направленных на создание новых методов мониторинга и регуляции численности насекомых-вредителей и переносчиков инфекционных заболеваний человека и животных.

Достоверность и обоснованность положений и выводов диссертации. Экспериментальные данные, лежащие в основе диссертационного исследования М.А. Бобровских, получены на большом объеме животных, с использованием современных методов, адекватных поставленным задачам, достоверность представленных в диссертации материалов не вызывает сомнений.

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации.

Принципиальных **замечаний** по сути работы нет, однако она не свободна от редакционных погрешностей. В работе встречаются неточности оформления (название линий дикого типа (*Canton S*) дрозофилы необходимо писать курсивом), орфографические и грамматические ошибки, досадные опечатки, стилистически неудачные и жаргонные выражения (стресс окружающей среды перегружает механизмы клеточной защиты (с. 16), генно-инженерные мыши (с. 19), дрозофила и ее ближайшие родственники (с. 41), мух стрессировали помещением пробирок с ними в термостат (с. 49) и т.д.).

После прочтения текста диссертации остаются следующие **вопросы**.

1. Кто является разработчиком приложения SeedCounter?
2. Какие компоненты сигнального каскада инсулина/инсулиноподобных факторов роста и стресс-связанные гормоны могут быть использованы

для регуляции численности насекомых и, возможно, разработки новых фармакологических средств?

3. Допускает ли автор непосредственное взаимодействие исследуемых стресс-связанных гормонов и компонентов инсулинового сигнального каскада с белками теплового шока?

Данные вопросы носят дискуссионный характер и не отражаются на общей высокой положительной оценке диссертационной работы.

Заключение.

Учитывая совокупность представленных в работе материалов, совершенно очевидно, что диссертационная работа М.А. Бобровских представляет собой многостороннее исследование взаимодействия звеньев сигнального каскада инсулина/инсулиноподобных факторов роста и гормонов, участвующих в нейроэндокринной стресс-реакции насекомых, что вносит значительный вклад в раскрытие механизмов адаптации.

Диссертация Маргариты Александровны Бобровских (Ереминой) на тему «Влияние кратковременного теплового стресса на экспрессию генов инсулинового сигнального каскада и углеводно-жировой обмен у *Drosophila melanogaster*», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – «генетика» является законченной научно-квалификационной работой, в которой сформулированы и обоснованы научные положения, совокупность которых можно классифицировать как новое решение задачи по совершенствованию представлений о взаимодействии стресс-связанных гормонов и ключевых компонентов инсулинового сигнального каскада, что имеет существенное значение для генетики.

Таким образом, диссертационная работа Бобровских (Ереминой) Маргариты Александровны, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «генетика», по содержанию, актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований и значению данных, соответствует критериям п.9,

