

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу Волковой Полины Юрьевны на тему «**Адаптивные реакции растений на действие ионизирующего излучения в низких дозах**», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.01 – радиобиология и 03.02.07 – генетика

Актуальность темы выполненной работы

Диссертационная работа Волковой Полины Юрьевны посвящена изучению молекулярных механизмов возникновения адаптивных реакций у растений при радиационном воздействии. Автор диссертации, известный специалист в области радиобиологии и радиационной генетики, представила уникальное по диапазону использованных методов исследование природных популяций сосны и проростков ячменя в лабораторных условиях после облучения низкими дозами ионизирующего излучения, не вызывающими выраженного фенотипического эффекта. Молекулярные механизмы, опосредующие реакцию растений на низкодозовое облучение, являются в настоящее время предметом интенсивного изучения. Это необходимо для создания научной основы прогнозов отдалённых последствий хронического облучения биоты. Актуальность темы исследования обусловлена также тем обстоятельством, что механизмы формирования эффекта стимуляции роста при воздействии физических факторов, в том числе ионизирующего излучения, до настоящего времени до конца не исследованы. В большинстве работ, посвященных исследованию ответных реакций растений на облучение, основные усилия направлены на изучение фенотипических признаков – морфометрических параметров и структуры урожая. При этом механизмы формирования наблюдаемых эффектов остаются нераскрытыми. В связи с этим особую актуальность имеет проведение биохимических и молекулярно-генетических исследований, направленных на выявление изменений в функциональных системах организма растений и их генетической регуляции в условиях действия низких доз излучения. Прогресс в расшифровке механизмов формирования адаптивных реакций живого на

радиационное воздействие позволит более эффективно использовать феномен радиационного гормезиса в практике современного сельского хозяйства, в частности при разработке технологий радиационной стимуляции семян.

В соответствии с этим, целью диссертационной работы П.Ю. Волковой стало выявление адаптивных реакций растений на разных уровнях биологической организации после облучения низкими дозами ионизирующего излучения.

Работа выполнена в рамках научно-исследовательских работ лаборатории радиобиологии и экотоксикологии сельскохозяйственных растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии» при поддержке грантами Российского научного фонда (проект 14-14-00666) и инициативных проектов РФФИ (№ 19-54-50003).

Новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

В работе П.Ю. Волковой впервые изучен чрезвычайно широкий спектр радиобиологических эффектов, возникающих в облучённых растениях под действием низких нелетальных доз ионизирующего излучения. Изучена генетическая изменчивость изоферментных и ДНК-маркеров природных популяций *P. sylvestris*, подвергающихся хроническому низкодозовому облучению с годовой мощностью дозы, считающейся безопасной для наземных экосистем (не превышающей 100 мГр/год). Проведен анализ активности ферментов в эндоспермах семян в ходе, которого впервые обнаружены изменения концентраций компонентов антиоксидантной системы и признаки окислительного стресса. Выявлены эпигенетические эффекты, заключающиеся в гиперметиловании генома хронически облучаемых деревьев и в контроле активности мобильных генетических

элементов. Впервые методом высокопроизводительного секвенирования РНК проведён транскриптомный анализ тканей хронически облучаемых деревьев *P. sylvestris* и обнаружено, что адаптивные реакции на хроническое облучение включают в себя модуляцию концентраций активных форм кислорода (АФК), контроль клеточных повреждений за счёт усиления экспрессии гистонов и белков теплового шока и модуляцию ионного баланса. Впервые функционально аннотированы вновь возникшие однонуклеотидные полиморфизмы в геномах хронически облучаемых деревьев *P. sylvestris*. Проведён комплексный биохимический анализ проростков семян *H. vulgare*, облучённых различными дозами γ -излучения, который обнаружил повышенные концентрации АФК в органах проростков через несколько дней после облучения. Впервые обнаружено, что низкие и высокие дозы облучения семян *H. vulgare* приводят к контрастным профилям экспрессии генов зародышей, которые функционально соответствуют обнаруженным фенотипическим изменениям проростков, выросших из облучённых семян. Впервые проанализирован метаболический профиль проростков облучённых семян ячменя и показано перераспределение доступного растениям азота и изменения концентраций стрессовых метаболитов. Впервые сформулированы общие закономерности формирования адаптивных реакций растений на низкие дозы ионизирующего излучения, включающие в себя синтез шаперонов и шапероноподобных белков, ответ системы фотосинтеза,

На основании анализа полученных экспериментальных данных разработана концептуальная схема формирования адаптивных реакций растений на низкие дозы ионизирующего излучения, включающая в себя синтез шаперонов и шапероноподобных белков, ответ системы фотосинтеза, и контроль уровней АФК.

Достоверность результатов исследования

Автором проанализирован огромный массив экспериментальных данных по формировании адаптивных реакций растений на радиационное воздействие. Центральный результат работы – усиленный синтез шаперонов и шапероноподобных белков в ответ на острое и хроническое облучение в низких дозах – несомненно значим и статистически достоверен: шесть генов белков теплового шока характеризуются схожими профилями экспрессии в наиболее загрязненных популяциях (Мас и Кул) при весьма значительных уровнях effect size ($\log_2FC \approx 2-4$).

Молекулярные исследования содержания ферментов и анализ транскрипционной активности соответствующих генов выполнены на современном методическом уровне. Полученные в работе результаты и сформулированные выводы полностью соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Обзор литературы, экспериментальные исследования и их анализ свидетельствуют о серьезной теоретической и методической подготовленности диссертанта. Сделанные выводы обоснованы и логически вытекают из результатов исследования.

По теме диссертации опубликовано более 100 печатных работ, 18 из них статьи в журналах, рекомендованных ВАК. Результаты работы были апробированы на 35-ти всероссийских и международных конференциях (Краков, 2012; Барселона, 2014; Миннеаполис, 2015; Берлин, 2017; Монпелье, 2018; Новосибирск, 2019 и др.). Автореферат и опубликованные работы достаточно полно отражают содержание диссертации.

Таким образом, полученные П.Ю. Волковой научные результаты и выводы являются обоснованными и достоверными.

Замечания

Принципиальных замечаний к работе нет. В целом четкий и ясный 350-страничный текст диссертации хорошо выверен и практически не содержит опечаток. В ряде случаев возникают сомнения в отношении оценок уровней приведенных эффектов и стиля подачи материала.

1. Корреляция между частотой мутаций изоферментов и уровнем радиационного воздействия выглядит подозрительно высокой: $r_s = 0.99$, $p = 0.001$ (стр. 138). Нечасто приходится видеть такие зависимости доза – эффект для природных популяций. Пересчет корреляции по данным, приведенным в таблицах 3.5 и 4.1, приводит к несколько иным оценкам: $r = 0.966$, $p = 0.0017$ для корреляции с суммарной дозой и $r = 0.967$, $p = 0.0016$ для корреляции с дозой γ -облучения. Жаль, что автор не приводит рисунок зависимости частоты мутаций от дозы. Он выглядит довольно убедительно.

2. На стр. 141 утверждается, что «дозозависимые изменения активности ферментов были обнаружены только для G6PDH ($r_s = 0.89$, $p = 0.019$)». Пересчет по данным, приведенным в таблице 5.1, показывает, что эта корреляция равна 0.80, что делает её незначимой ($p = 0.056$). Далее утверждается, что «активность остальных ферментов (GPX, SOD, CAT, MDH и LAP) не зависела от поглощённой дозы ($r_s = -0.80-0.10$, $p = 0.104-0.872$)». Беглый взгляд на табл. 5.1 обнаруживает, что по крайней мере для двух из этих ферментов (MDH и CAT) корреляция не может быть отрицательной.

3. Изложение важных результатов анализа уровня метилирования генома *P. sylvestris* весьма схематично и занимает всего лишь 3 страницы. Первичные данные не приводятся ни в тексте диссертации, ни в приложениях. Имеется лишь итоговый рис. 6.1 для доли метилированных цитозинов в различных популяциях. Это лишает возможности наглядно убедиться в значимости эффектов. Вероятно, следовало хотя бы оформить рис. 6.1 в виде «ящичков с усами» с указанием выбросов.

4. Слишком бегло изложены результаты анализа активности транспозонов (стр. 159). Отметим, что текст в автореферате полностью воспроизводит всё, что представлено в диссертации. Нет внятных пояснений, что изображено на рис. 6.2. Для 19 транспозонов представлена относительная активность по сравнению с контролем? Как она оценивалась? Это fold change экспрессии по отношению к контролю? Тогда при чем здесь логарифм числа транспозонов? И что отражает численная шкала на диаграмме? Думаю, многое было бы понятнее, если бы диаграмма 6.2 сопровождалась рабочей таблицей.

5. В случае транскриптомного анализ зародышей облучённых семян *H. vulgare* (стр. 122) указано, что дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) выявляли с учётом множественности сравнений. Но нет никаких упоминаний о поправках на множественность в случае анализа ДЭГ в хронически облучаемых популяциях *P. sylvestris* (стр. 164). Указано лишь, что критерием отбора было условие: $p < 0.001$ при $\log_2FC > |1|$. Возникает естественный вопрос: p - это p -value или FDR? Из методической части работы трудно также понять, сколько всего генов проверялось на предмет дифференциальной экспрессии.

6. При обобщении результатов анализа ДЭГ в популяциях *P. sylvestris* автор пишет: «Кластерный анализ профилей экспрессии сгруппировал две сильнозагрязнённые популяции (Мас и Кул), тогда как слабозагрязнённая популяция ЗК значимо не отличалась от контроля» (стр. 173). Здесь нужно заметить, что «слабозагрязнённая популяция ЗК» на 4 порядка превосходит по уровню загрязнения контрольные популяции и лишь в 2 раза уступает в этом отношении популяциям Мас и Кул.

7. Недостаточно ясно описана методика выявления «радиационно-индуцированных однонуклеотидных полиморфизмов» (SNP). В коротких методических пояснениях (стр. 118) перечислены R-программы, использованные для анализа транскриптомов, и указаны параметры различных фильтров. Всё это доступно лишь программистам и слабо

проясняет суть процедуры. По-видимому, речь идет о выявлении снипов, которые полиморфны в облучаемых популяциях, но гомозиготны в контрольной популяции. Причем в данном случае об «однонуклеотидных полиморфизмах» по-видимому можно говорить весьма условно, поскольку были проанализированы лишь по 3 дерева из каждой популяции. Далее автор пишет, что «идентичные SNP, присутствующие во всех образцах с конкретного участка, также исключали из анализа, поскольку наиболее вероятно, что они представляют собой пример популяционного, а не радиационно-индуцированного полиморфизма» (стр. 176). То есть исключали снипы, для которых контрольные и экспонированные популяции были фиксированы по альтернативным аллелям. Только этот вариант считался обусловленным популяционной дифференциацией, а остальные случаи (одно или два дерева с заменой соответствующего нуклеотида) объявлялись «радиационно-индуцированным полиморфизмом». Такая трактовка происхождения снипов выглядит достаточно произвольной. К тому же нет данных о снипах, полиморфных в контрольной популяции, но полностью мономорфных в экспонированных. Возможно число таких снипов сопоставимо с числом «радиационно-индуцированных полиморфизмов». Как и в случае анализа ДЭГ, нет никаких оценок общего числа SNP, выявленных описанной методикой. Без этих данных рис. 7.5 не слишком информативен. Кстати, следует отметить что число «радиационно-индуцированных полиморфизмов» в популяции ЗК оказалось в два раза выше, чем в популяции МАС, в которой уровень загрязнения максимален.

Отметим также, что достаточно сложно оценить статистическую значимость этих эффектов, связанных с числом «радиационно-индуцированных полиморфизмов» (автор и не пытается это делать). Вероятно, для этого нужны компьютерные имитации.

Еще одно замечание имеет дискуссионный характер. Автор рассматривает эпигенетические эффекты как исключительно адаптивную реакцию в ответ на хроническое облучение, то есть в рамках

неспецифического ответа популяций на действие стрессового фактора. Однако, изменения паттерна метилирования при воздействии радиации и других генотоксических агентов обнаруживают значительно более сложную картину. Прежде всего средний уровень метилирования в основном отражает метилирование повторов и транспозонов (80-90% генома). В норме эта часть генома сильно заметилована ($\beta > 0.8$). Однако, в промоторах большинства генов имеются обширные CpG-островки с очень низким уровнем метилирования ($\beta < 0.08$) в норме. Генотоксические и другие стрессовые воздействия (а также старение и возрастные заболевания) в основном приводят к гипометилированию сайтов, которые в норме сильно метилированы, и росту метилирования слабо метилированных CpG-сайтов в промоторах генов. Последний процесс, как правило, связан со снижением уровня транскрипции соответствующего гена. Эта, достаточно общепринятая схема, автором не рассматривается и не обсуждается. В обзоре эпигенетическим эффектам в облучаемых популяциях посвящена лишь одна фраза (стр. 49). Да, вполне возможно, что при низких дозах происходит некоторое увеличение среднего уровня метилирования, связанное с дополнительным метилированием повторов и транспозонов в рамках адаптивного ответа. Однако, скорее всего при больших дозах проростки облученных семян обнаружат тотальное гипометилирование, как это неоднократно наблюдалось для лабораторных животных и человека. Жаль, что подобные эксперименты автор диссертации не проделала. Это бы дополнило общую картину и действительно позволило бы говорить о наблюдаемом тотальном гиперметилировании, как об адаптивном ответе на стрессовый фактор.

Приведенные замечания не влияют на безусловно положительную оценку работы в целом. Сделанные замечания не носят принципиального характера и не ставят под сомнение значимость работы П.Ю. Волковой, полностью соответствующей требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Обобщение экспериментальных результатов, представленных в настоящей работе, вносит важный вклад в решение фундаментальной проблемы действия низких доз ионизирующего излучения на живые организмы, обосновывая общие молекулярные и биохимические закономерности адаптивных реакций растений на действие острого и хронического низкодозового облучения. Автор предложила целостную и последовательную концепцию биологического мониторинга радиационного воздействия на окружающую среду.

Результаты проведенного исследования вносят несомненный вклад в общее представление о механизмах адаптации растений к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Результаты работы соискателя включены в учебный процесс ИАТЭ НИЯУ МИФИ (дисциплины «Радиационная генетика», «Биологическая химия»).

Результаты работы могут быть также использованы в образовательных целях на биологических факультетах ФГОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», в ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, ГУ Научный центр биомедицинских технологий, ГУ Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина.

В целом полученные в работе результаты и сформулированные выводы полностью соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Обзор литературы разнесен по нескольким главам, и не упускает ни одной заметной публикации в области радиационной генетики и экологии хронически облучаемых популяций растений.

Представленный в главах 3 - 10 экспериментальный материал полностью оригинален и часто не имеет литературных аналогов. Проведенные исследования могут служить методической основой для экологического нормирования радиационного воздействия на биоценозы.

Заключение

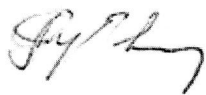
Таким образом, диссертационная работа Волковой Полины Юрьевны на тему «Адаптивные реакции растений на действие ионизирующего излучения в низких дозах», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.01 – радиобиология и 03.02.07 – генетика, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для радиационной биологии и генетики растений. Работа Волковой П.Ю. по актуальности изучаемой проблемы, научной новизне, практической значимости, полноте изложения и обоснованности выводов отвечает требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней и присвоения ученых званий» ВАК РФ, а автор заслуживает присуждения ей искомой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.01 – радиобиология и 03.02.07 – генетика.

«25» февраля 2020 г.

Зав. отделом генетической безопасности

ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,

доктор биол. наук



А.В. Рубанович

Подпись А.В. Рубановича заверяю:

Зам. директора по научной работе ФГБУН Институт общей генетики им.

Н.И. Вавилова РАН

кандидат биол. наук



С.А. Брускин

