

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель
Генерального директора

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна

ФМБА России

д.м.н., профессор

А.Ю. Бушманов

2020 г



ОТЗЫВ

ведущей организации – **Федерального государственного бюджетного учреждения Государственного научного центра Федерального медицинского биологического центра имени А.И. Бурназяна ФМБА России** на диссертацию **ВОЛКОВОЙ Полины Юрьевны «Адаптивные реакции растений на действие ионизирующего излучения в низких дозах»**, представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальностям **03.01.01 – Радиобиология и 03.02.07 – Генетика**.

Актуальность исследования

Диссертация Волковой П.Ю. направлена на решение важной радиобиологической задачи, связанной с изучением адаптивных реакций растений, формирующихся после низкодозового облучения. Усиливающееся антропогенное загрязнение и ускоряющиеся климатические изменения делают особенно актуальным изучение молекулярных основ адаптивных реакций культурных и дикорастущих растений. Подобные данные позволят повысить эффективность экологической ремедиации и создать новые устойчивые и продуктивные сорта сельскохозяйственных культур.

Молекулярные пути, опосредующие реакцию растений на низкодозовое облучение, являются в настоящее время предметом интенсивного изучения. Полевые исследования эффектов хронического радиационного воздействия создают научную основу для прогноза отдалённых последствий хронического облучения биоты, а работы по

расшифровке механизмов действия излучения в низких дозах на сельскохозяйственные культуры вносят вклад в обеспечение продовольственной безопасности, вышедшее на первый план в условиях ускоряющихся изменений климата. Таким образом, актуальность представленной работы по изучению адаптивных реакций растений в ответ на низкодозовое облучение определяется необходимостью минимизировать последствия одновременного действия климатических изменений и факторов антропогенной природы на дикорастущие и культурные растения. В качестве стрессового фактора в диссертационной работе рассматривается ионизирующее излучение в низких (не вызывающих выраженного фенотипического эффекта) дозах.

В диссертационной работе обобщаются обширные экспериментальные результаты, вносящие важный вклад в решение фундаментальной проблемы действия низких доз ионизирующего излучения на живые организмы. Приводится обоснование общих молекулярных и биохимических закономерностей адаптивных реакций растений на действие острого и хронического низкодозового облучения.

Тема диссертации соответствует заявленной научной специальности 03.01.01 – Радиобиология, охватывающей такие области исследований как молекулярно-клеточные и биохимические механизмы лучевого поражения (п. 3), последствия ядерных катастроф и радиоэкология (п. 9), принципы и методы радиационного мониторинга (п. 10) и отдалённые последствия действия излучений, хроническое действие радиации, особенности биологического действия малых доз облучения (п. 11) и формуле специальности 03.02.07 – Генетика, охватывающей такие области исследований как мутационная изменчивость, радиационный и химический мутагенез (п. 4), эпигенетика (п. 6), структурная, функциональная и эволюционная геномика, генетическая биоинформатика. (п. 12), популяционная генетика, генетическая структура популяций (п. 14) в

диссертации представлены обобщённые результаты комплексного анализа действия острого и хронического низкодозового облучения на растения на разных уровнях биологической организации.

Цель работы и задачи исследования корректно сформулированы, выводы соответствуют поставленным задачам. Методология исследования построена на принципе «от частного к общему», применение которого позволило сформулировать общее представление об адаптивных реакциях растений в ответ на облучение исходя из решения отдельных экспериментальных задач. Решение поставленных задач выполнено с использованием наиболее современных аналитических методов и методов обработки экспериментальных данных, что определяет обоснованность выводов, сделанных в диссертационной работе.

Научная новизна

Научная новизна работы заключается в анализе широкого спектра радиобиологических эффектов, возникающих в облучённых растениях под действием низких доз ионизирующего излучения. С использованием как изоферментных, так и ДНК-маркеров было впервые показано, что хроническое низкодозовое воздействие может изменять генетическую структуру популяций *P. sylvestris*, подвергающихся хроническому низкодозовому облучению с годовой мощностью дозы, считающейся безопасной для наземных экосистем (не превышающей 100 мГр/год). В экспериментальных популяциях *P. sylvestris* впервые обнаружены изменения концентраций компонентов антиоксидантной системы и признаки окислительного стресса и выявлены эпигенетические эффекты облучения. Впервые 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 генов, кодирующих гистоны и белки теплового шока, а также за

счёт модуляции ионного баланса. В геномах хронически облучаемых деревьев *P. sylvestris* также впервые были функционально аннотированы вновь возникшие однонуклеотидные полиморфизмы.

В диссертации впервые проведён комплексный биохимический анализ проростков семян *H. vulgare*, облучённых различными дозами γ -излучения, и выявлены повышенные концентрации АФК в органах проростков даже через несколько дней после облучения. Было 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.

В качестве основного вывода диссертации были впервые сформулированы общие закономерности формирования адаптивных реакций растений на низкие дозы ионизирующего излучения, включающие в себя синтез шаперонов и шапероноподобных белков, ответ системы фотосинтеза, контроль уровней АФК.

Теоретическое и практическое значение

Обобщение экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работе, вносит важный вклад в расшифровку общих молекулярных и биохимических закономерностей формирования адаптивных реакций растений на действие острого и хронического низкодозового облучения. Полученные результаты создают научную основу для обоснования новых принципов экологического нормирования, разрабатываемых в настоящее время рядом международных организаций (МКРЗ, МСР, МАГАТЭ). Выявленные в рамках диссертационной работы кандидатные гены и метаболиты, связанные со стимуляцией роста после

низкодозового облучения семян, могут быть использованы в биотехнологии растений для получения стрессоустойчивых и продуктивных сортов сельскохозяйственных культур.

Результаты, представленные в диссертации, опубликованы в рецензируемых международных журналах, в том числе входящих в Q1 базы данных Web of Science. По теме диссертации опубликовано 100 печатных работ, 18 из них статьи в журналах, рекомендованных ВАК. Результаты работы были доложены и обсуждены на десятках всероссийских и международных конференций.

Оценка содержания диссертации

Структура и объём диссертационной работы. Работа состоит из введения, 10 глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка использованной литературы, включающего 538 источников, из них 479 на иностранном языке, и 7 приложений. Диссертация изложена на 390 страницах, содержит 29 таблиц и 27 рисунков.

Во введении обсуждаются актуальность и степень разработанности проблемы, формулируются цели и задачи диссертационного исследования, положения, выносимые на защиту, научная новизна исследования, его теоретическая и практическая значимость. Кратко изложены методология и методы исследований, обоснованы методы оценки достоверности результатов и соответствие диссертации выбранным специальностям. Приведена информация об апробации работы и о личном вкладе автора диссертации в выполнение работы.

Глава 1 «Действие ионизирующего излучения на растения». На основании анализа отечественных и зарубежных литературных источников, ионизирующее излучение рассмотрено в качестве стрессового фактора, оказывающего как прямое, так и косвенное повреждающее действие на растения на разных уровнях биологической организации. Подробно

обсуждена роль активных форм кислорода во внутриклеточной передаче сигнала и отмечено, что АФК и сопряжённые с ними сигнальные пути могут играть ключевую роль в развитии адаптивных реакций растений в ответ на облучение в низких дозах.

Глава 2 «Материалы и методы исследования». В главе приведено описание объектов исследования: сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. и ячменя обыкновенного *Hordeum vulgare* L. Подробно описаны экспериментальные участки в зоне аварии на Чернобыльской АЭС и методы оценки почвенных характеристик и особенностей радиоактивного загрязнения. Описаны детали острого облучения и проращивания семян *H. vulgare*. Приведены подробные описания экспериментальных подходов, использованных в работе – анализа изоферментного полиморфизма, полиморфизма длины амплифицированных фрагментов, содержания низкомолекулярных антиоксидантов и малонового диальдегида, активности ферментов, концентраций фитогормонов, уровня полногеномного метилирования, содержания пероксида водорода. Обсуждена статистическая обработка экспериментальных данных. Приведены детали биоинформатической обработки данных секвенирования РНК, анализа ДНК-микрочипов, анализа метаболома.

Глава 3 «Особенности техногенного загрязнения экспериментальных участков в зоне Чернобыльской аварии». Глава содержит информацию о характере техногенного загрязнения и особенностях почв экспериментальных участков для изучения эффектов хронического радиационного воздействия в популяциях *P. sylvestris*. Экспериментальные участки расположены на территориях, загрязнённых радионуклидами в результате аварии на Чернобыльской АЭС в Брянской и Гомельской областях. В разделе 3.1 приведены данные о химических свойствах почв экспериментальных участков, которые в целом типичны для Центрального региона Российской Федерации и для Республики Беларусь. В разделе 3.2

показано, что концентрации тяжёлых металлов в почвах экспериментальных участков не превышали соответствующие ориентировочно и максимально допустимые концентрации в почвах, принятые в Российской Федерации и в Республике Беларусь. В разделе 3.3 обсуждается удельная активность радионуклидов в почве и биологическом материале в разные годы пробоотбора. В разделе 3.4 приведена медианная оценка годовых поглощённых доз в кронах *P. sylvestris* и показано, что основной вклад в формирование поглощённой дозы вносит ^{137}Cs , содержащийся в верхнем почвенном слое.

Глава 4 «Мутагенез и генетическая структура популяций *P. sylvestris* из зоны аварии на Чернобыльской АЭС». В разделе 4.1 приведены результаты анализа изоферментного полиморфизма метаболических и антиоксидантных ферментов, который выявил повышенную частоту мутаций в эндоспермах семян хронически облучаемых популяциях *P. sylvestris* в Брянской области, при этом частота мутаций коррелировала с уровнями радиационного воздействия, зарегистрированными на экспериментальных участках. Выявлено, что хроническое радиационное воздействие приводит к изменениям в генетической структуре экспериментальных популяций. В разделе 4.2 обсуждается исследование генетической структуры методом полиморфизма длины амплифицированных фрагментов, которое показало значимую корреляцию индекса генетического разнообразия Нея, оценённого при помощи AFLP-маркеров, с уровнем годовой поглощённой дозы. Изучение генетической структуры популяций *P. sylvestris*, произрастающих на территориях, загрязнённых радионуклидами, показало разную чувствительность молекулярных маркеров к хроническому облучению.

Глава 5 «Биохимические особенности ответа *P. sylvestris* на хроническое облучение». В разделе 5.1 приведены результаты анализа активности ферментов в эндоспермах семян. Дозозависимое изменение активности фермента были обнаружены только для глюкозо-6-

фосфатдегидрогеназы. Было показано, что мощности доз в Брянской области недостаточны для индукции значимых изменений ферментной активности в эндоспермах хронически облучаемых деревьев *P. sylvestris*. Раздел 5.2 содержит анализ концентраций низкомолекулярных антиоксидантов и малонового диальдегида в хвое. Показано, что концентрации низкомолекулярных антиоксидантов не зависели от уровня радиационного воздействия, однако на наиболее загрязнённых участках росло отношение концентраций восстановленного глутатиона к окисленному, что рассматривается в качестве адаптивной реакции в ответ на хроническое облучение. Концентрации маркера окислительного стресса малонового диальдегида в экспериментальных популяциях в целом были повышены, что указывает на снижение целостности мембран и активацию перекисного окисления липидов в клетках растений.

*Глава 6 «Эпигенетические изменения и контроль активности транспозонов в геномах хронически облучаемых деревьев *P. sylvestris*».* Раздел 6.1 показывает, что геномы деревьев *P. sylvestris*, произрастающих на радиоактивно загрязнённых территориях, были значимо гиперметилированы по сравнению с контрольным участком, при этом корреляции уровня метилирования с поглощённой дозой не обнаружили. В разделе 6.2 представлены результаты изучения активности транспозонов в геномах хронически облучаемых деревьев *P. sylvestris*, которые свидетельствуют о том, что хроническое облучение изменяет активность транспозонов в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной. Характер изменения активности мобильных генетических элементов указывает на существование дозового порога для индукции механизмов, контролирующих активацию транспозонов. Выдвинуто предположение, что радионуклидный состав загрязнения может играть роль в контроле активности транспозонов.

Глава 7 «Дифференциальная экспрессия генов и анализ однонуклеотидных полиморфизмов в хронически облучаемых популяциях

P. sylvestris». В разделе 7.1 приводятся детали получения сборки транскриптома *de novo* и результаты кластеризации экспериментальных популяций. Раздел 7.2 содержит детальный анализ дифференциальной экспрессии генов в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной, по результатам которого автор выделяет основные группы адаптивных реакций в ответ на хроническое облучение, включающие в себя модуляцию накопления АФК путём поддержания баланса между процессами производства АФК и антиоксидантными молекулами, контроль клеточных повреждений за счёт усиления экспрессии генов, кодирующих гистоны и белки теплового шока, сопровождаемой модуляцией ионного баланса и контроль активности транспозонов. Раздел 7.3 продолжает обсуждение данные, полученных при помощи секвенирования РНК хвои экспериментальных деревьев, и содержит данные о вновь возникших однонуклеотидных полиморфизмах, которые часто возникают в транскриптах, относящихся к антиоксидантной системе и к процессам окисления-восстановления. Данная глава завершает блок экспериментальных данных, относящихся к анализу долгосрочных последствий хронического низкодозового облучения в популяциях *P. sylvestris*.

Глава 8 «Биохимические изменения в проростках *H. vulgare*, индуцированные облучением семян». Рассматривая радиационную стимуляцию роста как одну из форм адаптивных реакций растений на действие низких доз излучения, в данной главе автор обсуждает данные ряда экспериментов, проведённых на проростках ячменя, выросших из облучённых семян. Раздел 8.1 демонстрирует, что изменения активности ферментов в проростках облучённых семян *H. vulgare* могут быть частью адаптивной реакции, выражающейся в стимуляции роста растений, облучённых низкими (10-20 Гр) дозами ионизирующего излучения. В разделе 8.2 анализируются концентрации фитогормонов в проростках облучённых семян и показан сдвиг фитогормонального баланса в сторону фитогормонов-стимуляторов роста при облучении семян ячменя обыкновенного низкими

дозами облучения (4-20 Гр) или в сторону ингибитора роста АБК при облучении семян ингибирующей дозой 50 Гр. Завершает главу раздел 8.3, в котором показано что концентрации пероксида водорода в проростках облучённых семян значимо повышены в органах проростков облучённых растений.

Глава 9 «Профиль экспрессии генов в зародышах облучённых семян *H. vulgare*». Раздел 9.1 в данной главе содержит информацию о морфологических особенностях проростков облучённых семян и анализ микрофенологических фаз прорастания, проанализированных на урожае того же года, что использовали и для анализа транскриптома. Раздел 9.2 содержит подробный анализ особенностей транскриптома зародышей облучённых семян и демонстрирует, что низкие и высокие дозы облучения семян приводят к контрастным профилям экспрессии генов зародышей. Обнаружено подавление передачи сигналов АБК в ответ на облучение в низкой дозе и индукция ответа на жасмонат и цитокинины, что вновь позволяет автору предположить, что стимулирующий эффект облучения в низких дозах зависит и от модуляции уровней фитогормонов. В свою очередь, фитогормональный сигналинг взаимосвязан с сигналингом АФК, и, по-видимому, может участвовать в поддержании повышенных концентраций пероксида водорода в тканях облучённых растений.

Глава 10 «Анализ метаболома проростков облучённых семян *H. vulgare*». В данной главе представлены результаты работы по анализу метаболома проростков облучённых семян ячменя и приведена подробная схема метаболических изменений в корнях и побегах облучённых растений. Раздел 10.1 описывает фенотипические особенностей растений, использованных для метаболомного анализа. В разделе 10.2 обсуждены общие метаболические изменения в тканях облучённых растений. Раздел 10.3 касается изменений в метаболизме азота в проростках облучённых семян ячменя: предполагается перераспределение азота между метаболитами,

вовлечёнными в его транспорт и хранение. В разделе 10.4 описаны выявленные особенности метаболитов стрессового ответа и показано, что умеренные повреждения в клетках растений, облучённых низкими дозами γ -излучения, приводят к мобилизации запасных веществ эндосперма.

Заключение «Концептуальная схема развития адаптивных реакций растений при действии ионизирующего излучения в низких дозах».

Данный раздел суммирует все эксперименты, обсуждённые в диссертации. Автор предлагает концепцию развития адаптивных реакций растений при действии ионизирующего излучения в низких дозах, уделяя особое внимание вторичных АФК, которые поддерживают изменённый редокс-гомеостаз и влияют на процессы внутриклеточного сигналинга. Автор отмечает, что сочетанная активация антиоксидантной системы, фитогормонального сигналинга, системы контроля качества белков приводит к метаболическим изменениям и к формированию адаптированного фенотипа, носители которого могут успешно существовать и размножаться в условиях низкодозового облучения.

Заключение и выводы работы представляются обоснованными и подкреплены большим количеством экспериментальных материалов.

Замечания:

Замечаний принципиального характера к работе нет. Текст диссертации и автореферата тщательно выверен. Тем не менее, в тексте диссертации всё ещё присутствуют незначительные смысловые погрешности и неточности.

- стр. 10, 6-7 строка сверху, "...вовлечённых в цепные реакции, повреждающие клеточные мембраны, белки и ДНК...". Мембраны состоят из липидов и белков, поэтому более корректно было бы написать "...вовлечённых в цепные реакции, повреждающие липиды, белки и ДНК...".

- стр. 11, 16-17 строка сверху, "В ДНК АФК провоцируют разрывы сахарофосфатных цепей". А как же другие типы повреждений ДНК, такие как модификация и потеря азотистых оснований, сшивки ДНК-ДНК и ДНК-белок?

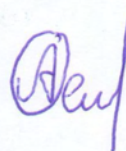
Указанные неточности относятся скорее к категории опечаток, они несколько не уменьшают научной и практической значимости работы, не затрагивают её основных выводов и не влияют на общую положительную оценку выполненной автором работы.

Заключение

Диссертация Волковой П.Ю. является самостоятельной завершённой научно-квалификационной работой на актуальную тему. Новые научные результаты, полученные автором, имеют существенное значение для науки и практики. Работа вносит весомый вклад в решение фундаментальной и практической научной проблемы, связанной с изучением механизмов адаптивных реакций растений на действие ионизирующего излучения. Положения, вынесенные на защиту, и выводы достаточно обоснованы. По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов, объёму выполненной автором работы диссертация Волковой П.Ю. «Адаптивные реакции растений на действие ионизирующего излучения в низких дозах» соответствует всем критериям, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора биологических наук, установленных в «Положении о порядке присуждения учёных степеней», утверждённых Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 с дополнениями от 21 апреля 2016 года № 335, а её автор **Волкова Полина Юрьевна** заслуживает присуждения ей учёной степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.01 – Радиобиология и 03.02.07 – Генетика.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании секции № 1 ученого совета
ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна, протокол заседания №2 от 12 марта
2020 г.

Заведующий отделом экспериментальной
радиобиологии и радиационной медицины,
доктор биологических наук, профессор РАН



А.Н. Осипов

Заведующая лабораторией радиационной биофизики,
кандидат биологических наук



Н.Ю. Воробьева

Федеральное государственное
бюджетное учреждение «Государственный научный центр
Российской Федерации – Федеральный медицинский
биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России.
123098, г. Москва, ул. Живописная, 46
Тел/факс (499) 190-95-78, 190-85-73
<http://fmbafmbc.ru/>
e-mail: fmbc-fmba@bk.ru