

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу Літвінова Сергія В'ячеславовича

«Зв'язок транскрипційної активності ключових генів репарації ДНК з пострадіаційним відновленням рослин», яка представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) зі спеціальності "03.00.01 – радіобіологія".

Актуальність обраної теми. Дослідження системи відповіді клітини на ураження ДНК (DNA damage response), насамперед шляхів репарації радіаційно-індукованих пошкоджень ДНК, відносяться до основоположних завдань сучасної радіобіологічної науки. Радіація викликає найрізноманітніші за своїм спектром пошкодження ДНК, ефективність репарації яких визначає пострадіаційну «долю» клітини. За своїми наслідками дволанцюгові розриви ДНК є найбільш критичними пошкодженнями геному еукаріот, що можуть призводити до загибелі клітини, мутацій, структурних перебудов хромосом, неопластичної трансформації клітини тощо. Разом з багаторічними дослідженнями ключових механізмів репарації дволанцюгових розривів ДНК особливої актуальності в останні роки набуває вивчення мутагенних шляхів репарації, пов'язаних з мікрогомологічним зв'язуванням кінців (MMEJ), репарацією помилково спарених нуклеотидів (MMR) та інших.

Не дивлячись на відносну еволюційну консервативність системи репарації пошкоджень геному, а також великий масив даних щодо ключових механізмів репарації пошкоджень ДНК у еукаріотів, їхня роль у формуванні радіорезистентного фенотипу у вищих рослин залишається малодослідженою. Зокрема це стосується досліджень експресії ключових генів репарації ДНК за дії іонізуючого випромінювання у малих дозах та різних режимах на вищі рослини. Серед них дисертант виділив для досліджень особливостей радіаційно-індукованих ефектів у модельної рослини *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh найважливіші маркери репарації ДНК, зокрема маркер процесів гомологічної рекомбінації *AtRAD51*, негомологічного з'єднання кінців в місцях дволанцюгових розривів ДНК *AtKu70*, ексцезійної репарації нуклеотидів *AtRAD1*, а також маркера

помилкового спарювання нуклеотидів (місметч-репарації), а також регуляції рекомбінаційних процесів у клітині – продукту гена *AtMsh2*.

Враховуючи вище викладене, без сумніву, дисертація Літвінова С.В., є актуальною та знаходиться на вістрі сучасних наукових тенденцій, оскільки її проблематика поєднує питання фундаментальної радіобіології (вивчення залежностей доза-ефект) з молекулярною біологією, генетикою, фізіологією рослин.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась протягом 2011-2018 рр. у відділі біофізики та радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України як фрагмент бюджетних тем: «Епігеномна складова адаптації у рослин» (державний реєстраційний номер роботи № 0108U000875, 2008-2012); III-4-13 «Роль епігеномних механізмів в адаптогенезі рослин» (державний реєстраційний номер роботи 0113U000228, 2012-2016); II-3-12 «Розробка способів скерованого впливу на сигнальні системи і епігенетичну пластичність культурних рослин для підвищення їх продуктивності та стійкості» (державний реєстраційний номер роботи 0112U003077, 2012-2016); II-4-07 «Виділення та аналіз стрес-стійких форм рослин з їх популяцій, сформованих в умовах хронічного опромінення, методом біомаркерів» (2007–2011, державний реєстраційний номер теми 0107U002870); а також в рамках проекту European Commission FP-7-PEOPLE IRSES GA-2013-612587 «Plant DNA tolerance».

Обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих в дисертації, їх достовірність. Наукові положення та висновки, сформульовані дисертантом, ґрунтуються на результатах власних багаторічних досліджень. Автором застосована експериментальна модель, яка включала дослідження залежностей «доза-ефект» для обраних ключових генів репарації за різних режимів радіаційної дії: гострого, повторюваного та хронічного опромінення в діапазоні відносно малих доз, вивчення зв'язку радіаційно-індукованої експресії генів з морфометричними та фізіологічними параметрами пострадіаційного відновлення у *Arabidopsis thaliana*, можливість

трансгенераційної передачі виявлених ефектів. Для досягнення мети роботи були визначені конкретні завдання, після вирішення яких дисертант отримав надзвичайно великий обсяг експериментальних даних, достовірність яких забезпечена як чисельністю вибірки, повторюваністю дослідів, так і сучасними методами досліджень, коректним статистичним аналізом.

Результати роботи у повному обсязі представлено у 25 наукових публікаціях, серед них – розділ у колективній монографії, 7 статей, з яких 5 опубліковано у фахових виданнях України, з них 3 статті – у виданнях, що входять до наукометричних баз SCOPUS та WOS; 2 статті – у іноземних журналах з відкритим доступом, а також апробовано на вітчизняних та міжнародних наукових форумах.

Наукова новизна одержаних результатів та їх практична значимість.

Результати дисертаційного дослідження Літвінова С.В. істотно розширюють уявлення щодо процесів репарації пошкоджень ДНК, індукованих відносно малими дозами радіації в рослинній клітині. Аналіз наукової літератури свідчить, що дисертантом вперше проаналізовано дозову залежність ранньої транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51* та *AtRAD1* в діапазоні відносно малих доз у модельного об'єкта *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, при цьому визначено немонотонний характер цієї залежності. Цінними з наукової точки зору є положення, що опромінення у відносно малих дозах може не тільки стимулювати, але і пригнічувати транскрипцію генів репарації ДНК рослинної клітини, а також призводити до появи нетипових форм мРНК.

Дисертантом вперше показано самостійну роль MSH2 – одного з ключових білків системи місметч-репарації у пострадіаційному відновленні ДНК, а також особливості його взаємодії з продуктами генів *AtRad1* і *AtRAD51*.

Автором вперше встановлено можливість трансгенераційної передачі зміненої активності генів *AtRAD51* та *AtRad1* у нащадків першого покоління опромінених зразків *Arabidopsis thaliana*.

Практична цінність одержаних результатів полягає, насамперед, у продемонстрованій можливості спрямованої зміни експресії ключових генів

репарації пошкоджень ДНК та їх трансгенераційної передачі в умовах дії іонізуючого випромінювання з визначеними характеристиками. Результати дослідження є перспективними з точки зору удосконалення засобів та методів адаптації вищих рослин до дії стрес-агентів довкілля, а також можливостей модифікації значущих з селективної точки зору характеристик рослин.

Загальна оцінка змісту дисертації та її оформлення. Дисертаційна робота Літвінова С.В. побудована відповідно до «Вимог до оформлення дисертації, затверджених Наказом МОН України № 40 від 12.01.2017 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» і складається із анотації українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів досліджень, трьох розділів з описом одержаних власних результатів досліджень, узагальнення, висновків, списку використаної літератури (202 найменувань), з яких 168 англійських. Дисертація викладена на 199 сторінках друкованого тексту, містить 32 рисунки і 16 таблиць.

У **вступі** обґрунтовано актуальність проблеми, сформульовано мету, завдання роботи, висвітлено новизну та практичну значимість роботи, наведено відомості про апробацію роботи.

У **розділі 1** представлено ґрунтовний аналіз сучасної наукової літератури щодо особливостей формування радіаційно-індукованих ефектів та шляхів пострадіаційного відновлення рослинного організму, який свідчить про ерудованість та ґрунтовні знання дисертанта з обраної наукової проблематики. У розділі логічно обґрунтовано вибір об'єкту та предмету досліджень.

У **розділі 2** “Матеріали та методи дослідження” дисертант надає детальний опис етапів дослідження, умов вирощування модельної рослини, різних режимів опромінення, методів визначення відносної транскрипційної активності дослідних генів, інфрачервоної Фур'є-спектроскопії дослідних зразків, біометрії та статичного аналізу даних.

Результати досліджень представлено у трьох окремих розділах, що містять великий обсяг фактичного матеріалу, а також оригінальних пояснень, припущень, гіпотез щодо механізмів виявлених явищ.

Розділ 3 присвячено дослідженням ранньої транскрипційної відповіді генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* на дію іонізуючої радіації у сублетальних дозах в різних режимах опромінення. Дисертантом визначено немонотонний характер дозової залежності активації дослідних генів у відносно вузькому діапазоні доз радіації. Для пояснення екстремумів на кривій дозової залежності, автор висуває гіпотезу про ураження популяції радіочутливих клітин з наступною активацією процесів репарації та проліферації у субпопуляції відносно радіостійких тканин листка. Цікавим фактом, що потребує додаткового пояснення, є факт кореляції між експресією генів *AtKu70* та *AtRAD51* при гострому та повторюваному опроміненні.

Представлений аналіз патернів експресії генів за різних режимів опромінення поглиблює уявлення щодо особливостей реакції рослинної клітини на хронічну дію радіації у відносно малих дозах. Важливим результатом роботи є виявлена дисертантом здатність хронічного іонізуючого випромінювання з низькою потужністю дози індукувати та модифікувати активність генів *AtRad1* і *AtRAD51*, яка зберігалась протягом 35 діб після опромінення. Одержані дані також демонструють, що за хронічної дії радіації в малих дозах активуються відносно мутагенні шляхи репарації пошкоджень ДНК, що опосередковуються *AtRad1*.

Отримані дисертантом результати підтвердили, що патерни ранньої індукцію генів *AtRAD51* та *AtRad1* за одноразового та повторюваного опромінення можуть успадковуватись трансгенераційно.

Результати **розділу 4** демонструють вірогідний вплив хронічного опромінення в малих дозах на показники росту та розвитку *A.thaliana*. Дисертант робить важливі припущення щодо ролі пострадіаційної активації гена *Rad1* у ATR-опосередкованій зупинці циклу клітин меристем, що призводить до формування R-фенотипу рослин.

У **розділі 5** проаналізовано одержані залежності морфометричних параметрів опромінених рослин від дози та режимів опромінення, їх кореляцію з транскрипційною активністю генів репарації.

Із застосуванням методу інфрачервоної спектроскопії Фур'є (FTIR) визначено та проаналізовано цілий набір біохімічних та фізіологічних показників в листках, опромінених у дозі 21 Гр, що свідчать про ряд негативних перетворень в тканинах: деградацію нуклеїнових кислот і ліпідів, зниження вмісту та зміну конформації білків, руйнування лігнінових волокон, модифікація складу клітинної стінки, накопичення крохмалю, деградацію хлорофілу, синтез пурпурово-фіолетових пігментів.

У цьому ж розділі дисертант наводить дані щодо відносної радіочутливості рослин, мутантних за геном місметч-репарації *AtMSH2*, яка немонотонно залежала від дози та режиму опромінення.

Важливо, що у розділі «**Узагальнення результатів**» дисертант не тільки дає загальну характеристику змісту та результатів роботи, а й пропонує власні інтерпретації та гіпотези щодо особливостей індукції ранньої транскрипційної активності ключових за дії радіації, представляє оригінальну загальну схему формування радіобіологічної відповіді рослин на іонізуюче випромінювання у дослідженому інтервалі доз та режимах опромінення. Вона супроводжується детальними описом та роз'ясненнями щодо власного бачення цього складного багатоетапного процесу. В кінці розділу одержані результати представлено відповідно їх значущості для загальної радіобіології, радіобіології рослин, а також медичної радіобіології. **Висновки** відповідають поставленій меті та завданням дослідження, відображають найвагоміші результати роботи.

Загалом, дисертантом одержано надзвичайно великий масив експериментальних даних, аналіз яких супроводжується інколи гіпотетичними, проте оригінальними міркуваннями та поясненнями. При цьому матеріал дисертації викладено грамотно, логічно, наукова термінологія є загальновизнаною. Висновки до кожного розділу і дисертації в цілому відображають суть виконаних досліджень. Зміст автореферату повністю відповідає змісту та основним положенням дисертації.

Зауваження щодо змісту й оформлення. Позитивно і високо оцінюючи дисертаційну роботу, вважаю за необхідне зазначити наступні зауваження, дискусійні положення та запитання?

1. У змісті, починаючи з Розділу 2, сторінки не відповідають розміщенню розділів у тексті роботи.
2. В розділі «Матеріали та методи» розміщено фото приладів, взятих на сайті виробника, або ж стандартних установок, проте було б достатньо їхнього повторного зображення на принциповій схемі дослідів.
3. Недоречним, на мою думку, є положення щодо значущості одержаних дисертантом результатів для медичної радіобіології (с. 182). Зокрема, висновку про важливість фракціонування дози опромінення з вказаним інтервалом у 24 години та рекомендації щодо необхідності розробки інгібіторів білкових продуктів RAD51 та Ku70 (продукт гену *XRCC6* у людини) в якості протипухлинних агентів, оскільки такі дослідження таргетної терапії активно, проте поки безрезультатно, проводяться протягом останнього десятиліття.
4. В роботі діапазон доз рентгенівського випромінювання 3-21 Гр визначено як діапазон сублетальних доз, при чому доза 21 Гр фігурує як порогова сублетальна доза. При цьому відомо, що *Arabidopsis thaliana* відрізняється відносно високою радіостійкістю, її середня $LD_{50/30}$ за літературними джерелами складає біля 300 Гр для рідкоіонізуючого випромінювання. Чим можна пояснити вибір діапазону доз опромінення саме як сублетального?

При визначенні дозових навантажень хронічного опромінення дисертант посилається на визначення малих доз як таких, що завідомо не перевищують верхню межу за критеріями, прийнятим НКДАР ООН та МАГАТЕ. Проте слід пам'ятати, що офіційні порогові значення, визначені в цих документах, є відносними і базуються, насамперед, на даних радіаційної гігієни та епідеміології щодо симптоматики радіаційно-індукованих детерміністичних та стохастичних ефектів у людини. Це дози нижче 100 мГр та потужності

доза нижче 0,1 мГр/хв при відомій LD_{50/60} для людини біля 3Гр за умов гострого тотального рідкоіонізуючого опромінення.

5. Цікавим результатом, одержаним дисертантом, є можливість трансгенераційного наслідування підвищеної активності генів *AtRad1* та *AtRAD51*. Які механізми, на Вашу думку, лежать в основі цього явища?

Зазначені зауваження та побажання є непринциповими, мають рекомендаційний характер та не ставлять під сумнів основні результати та висновки роботи.

Таким чином, дисертаційна робота Літвінова Сергія В'ячеславовича є самостійною завершеною науковою кваліфікаційною роботою. За обсягом, актуальністю, методичним рівнем та науковою значимістю дисертаційна робота Літвінова С.В. повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів» Постанови Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. щодо кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.01 – радіобіологія.

Офіційний опонент:

с.н.с. відділу радіобіології
та радіоекології
Інституту ядерних досліджень
НАН України
кандидат біол. наук,
старший дослідник



Рябченко Н.М.

Підпис Рябченко Н.М.
Засвідчую
Вчений секретар ІЯД НАНУ



Дорошко Н.Л.