

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Літвінова Сергія В'ячеславовича «Зв'язок транскрипційної активності ключових генів репарації ДНК з пострадіаційним відновленням рослин», поданої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) зі спеціальності 03.00.01 – радіобіологія

Те, що існує зв'язок між репарацією ДНК і післярадіаційним відновленням не тільки одноклітинних, але й багатоклітинних організмів, відомо давно, зокрема з робіт Д.М. Гродзинського та його співробітників, представником школи якої, вже у третьому поколінні, є й дисертант. І цю роботу можна розглядати як продовження цього фундаментального циклу, який дозволяє зрозуміти на більш високому молекулярно-генетичному рівні механізми цих явищ та їх взаємозв'язок, а саме, виявити зв'язок ранньої транскрипційної відповіді основних генів репарації ДНК з ефективністю післярадіаційного відновлення рослин. У цьому полягає актуальність роботи С.В. Літвінова.

Дисертація вкладає на 199 сторінках тексту, складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, трьох розділів, що містять результати власних досліджень, узагальнення, висновків, списку літератури й включає 32 рисунки і 16 таблиць.

У **першому розділі**, котрий має назву «Взаємозв'язок молекулярного та організменого рівнів формування відповіді рослин на опромінення» і виконує функції огляду літератури по темі, дисертант розглядає радіобіологічні ефекти з позицій системної біології. На основі наявних у сучасній радіобіології даних він вважає, що значна частина ефектів радіації на рівні організму в інтервалі сублетальних доз може бути зумовлена активацією індукцибельної системи репарації ДНК. Зокрема це стосується явищ радіостимуляції, радіоадаптації та радіосенсибілізації, радіаційно індукованої нестабільності геному. Пострадіаційне відновлення рослин відповідно до принципу закономірного зв'язку ієрархічних рівнів живого зазнає впливу модифікованої активності систем репарації ДНК, особливо

тих, що приймають участь у підтримці структурної цілісності геному. Репарація потенційно летальних пошкоджень – дволанцюгових розривів ДНК – підтримує проліферацію меристематичних клітин, що забезпечує нормальний онтогенез, формування властивого певному виду та екотипу рослин фенотипу, репопуляційне відновлення твірних тканин.

Все це дозволяє йому дійти до висновку про те, що незважаючи на значну кількість досліджень, присвячених репарації дволанцюгових ДНК, недостатньо вивченими залишаються питання радіаційно індукованої модифікації активності генів репарації ДНК рослин у інтервалі сублетальних доз рідкоіонізуючого опромінення. І саме дослідження дисертанта є спрямованими на прояснення цих важливих радіобіологічних проблем.

У **другому розділі** матеріалів і методів досліджень описаний добре відомий і вивчений як радіобіологами, так і генетиками об'єкт *Arabidopsis thaliana* (різушка), обґрунтовується його вибір, викладається методологія досліджень, суть молекулярно-генетичних методів, застосованих у роботі. Тут слід відзначити, що використані методи відповідають сучасному рівню біологічної науки – полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), інфрачервона Фур'є спектроскопія з подальшим статистичним аналізом методами математичної статистики та біометрії.

Результати досліджень описані в **розділах 3–5**. Зокрема у **розділі 3** викладені дані, які доводять, що режим та доза опромінення достовірно позначаються на рівні транскрипційної активності досліджуваних генів підтримки стабільності геному *A. thaliana*. Вивчення транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* показало відсутність статистично достовірних відмінностей між рослинами дикого типу та мутанту *Atmsh2 SALK_002708*. У клітинах листя неопромінених рослин присутні мРНК білків *AtRad1* та *AtKu70*, але не *AtRAD51*. Як одноразове, так і фракціоноване опромінення викликало підвищення транскрипційної активності генів *AtKu70* і *AtRAD51* при дозах 3 Гр, 6 Гр, 9 Гр, 21 Гр. Дози 3 Гр та 21 Гр обумовлювали максимальний ефект активації сумарної транскрипції генів *AtKu70* та

AtRAD51 при одноразовому опроміненні, а дози 6 Гр та 15 Гр – при повторюваному опроміненні.

При фракціонованому опроміненні у дозі 12 Гр, а також одноразово у дозі 15 Гр спостерігалась транскрипційна репресія гена, що кодує фактор негомологічного з'єднання кінців дволанцюгових розривів ДНК *AtKu70*. Це поєднувалось з активацією експресії гена *AtRad1*. Таким чином, встановлено, що іонізуюче опромінення у сублетальних дозах здатне як активувати, так і пригнічувати експресію ключових генів репарації структурних пошкоджень ДНК. На основі отриманих даних робиться висновок про те, що гени *AtRad1* та *AtKu70* у тканинах листків арабідопсису напередодні переходу рослин до цвітіння експресуються конститутивно та індукцельно, а ген *AtRAD51* – тільки індукцельно.

У розділі 4 описаний вплив малих доз хронічного опромінення насіння і проростків на їх ріст та розвиток. Серед основних виявлених біологічних ефектів іонізуючої радіації можна виділити такі: збільшення енергії проростання насіння, викривлення головного корінця, більш раннє формування первинної розетки, збільшення повітряно-сухої маси надземної частини пагону, прискорений ріст стебла, скорочення термінів початку цвітіння, скорочення тривалості вегетаційного періоду, зменшення маси повітряно-сухої надземної частини пагону, поява рослин з морфологічними аномаліями та збільшення частки стерильних рослин з редукованим фенотипом. Дисертант підкреслює, що стимулюючий ефект опромінення насіння реалізується не відразу, як при хронічному опроміненні проростків, а на етапі ініціації верхівкового росту пагона і до настання генеративної фази. Висока варіація вегетативних та генеративних морфометричних показників, підвищення частоти морфометричних аномалій у дослідному варіанті свідчать про високу індивідуальну мінливість рослин за стійкістю до низькодозового хронічного опромінення.

Результати досліджень, описані у розділі 5, дозволяють дисертанту стверджувати, що ефекти сублетальних доз зумовлені неоднорідністю

окремих популяцій клітин у меристемах, а також гетерогенністю меристем та окремих рослин всередині однієї лінії за радіостійкістю. Найвищою радіочутливістю відрізняються інтеркалярна меристема міжвузлів та високоактивна у період переходу до цвітіння генеративна меристема. Відносно нижча радіочутливість властива апікальній меристемі. Найбільш радіостійкою на стадії переходу до фази генеративного розвитку є латеральна меристема судинних пучків листя, від стану якої залежить довгострокове збереження життєздатності листка. Незважаючи на те, що повторюване опромінення загалом менш ефективно індукувало експресію генів репарації ДНК у порівнянні з одноразовим, саме при цьому режимі спостерігався тісний зв'язок між активністю досліджуваних генів та динамікою морфометричних показників у пострадіаційний період.

Дисертант встановив, що трансгенераційна передача підвищеної транскрипційної активності ключових генів підтримки структурної цілісності геному корелює з фенотипними ефектами у неопроміненому потомстві опромінених рослин. Фракціонування дози з 24-годинним інтервалом у порівнянні з одноразовим опроміненням викликає більш виражений та тісний зв'язок між морфометричними характеристиками опромінених рослин та їхнього потомства. Підвищена активність гена *AtRad1* у клітинах неопромінених рослин першого покоління, вирощених з насіння опромінених рослин, пов'язана із зниженням схожості й 30-денної виживаності та підвищеною частотою морфологічних аномалій. Все це дозволяє розглядати підвищену транскрипційну активність гена *Rad1* через тривалий час після дії на організм рідко іонізуючої радіації в якості маркера індукованої нестабільності геному.

Ним показано, що в основі спостережуваних радіобіологічних ефектів може лежати реакція клітин на пошкодження ДНК. Незначна кількість пошкоджень активує транскрипцію низки генів репарації ДНК, які прискорюють нормальне проходження реплікації та подолання зупинки клітинного циклу. Якщо ж при дозах опромінення, вищих за стимулюючі, у

структурі ДНК меристематичних клітин виникають критичні пошкодження, то навпаки, клітинний цикл блокується та пригнічується репопуляція клітин. В цьому випадку ріст та розвиток рослин зупиняється.

Узагальнюючи результати досліджень у **розділі 6**, дисертант поділяє їх на три групи за рівнем значущості: загально радіобіологічні, такі, що стосуються радіобіології рослин та медичної радіобіології, точніше напрямку медичної радіології, яка займається радіаційною терапією злоякісних новоутворень. В останньому немає нічого дивного, так як закономірності розмноження і росту клітин у твірних постійно оновлюваних тканинах однакові у рослин і тварин. Багато з них, які були встановлені на меристемах рослин, пізніше знайшли підтвердження у дослідженнях онкологів. І в цьому також полягає актуальність даної роботи.

Шість висновків адекватно і достатньо змістовно відображають основні досягнення і наукову новизну роботи.

Результати дисертаційної роботи опубліковані у провідних фахових виданнях, апробовані на багатьох міжнародних конференціях і з'їздах.

Автореферат віддзеркалює достатньо повно і всебічно зміст дисертації.

Зауваження та побажання щодо дисертації

1. Об'єкт досліджень різущка Таля (гусимка звичайна), *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. фігурує в роботі під п'ятьма назвами – і ті, що названі, а також *Arabidopsis* латиницею, *A. thaliana*, арабідопсис кирилицею, часом по-різному на одній сторінці. Так не можна, не бажано.

Взагалі об'єкт зручний з точки зору молекулярної генетики, але не зовсім зручний з точки зору радіобіології – належить до однієї з найрадіостійкіших родин вищих рослин – капустяних. Такі дослідження бажано проводити на радіочутливих видах. Це наближує модельні дослідження до поняття механізмів радіобіологічних ефектів у ссавців, у людини.

2. Дисертант оперує таким поняттям, як «діапазон сублетальних доз», досить точно визначаючи його для *A. thaliana* як 0,2–21 Гр. На підставі чого?

І чи можна стимулюючі дози включати у цей діапазон? І взагалі, що дисертант розуміє під сублетальними, тобто «підлетальними дозами» - весь діапазон від нуля до летальних доз? Де місце у цьому діапазоні півлетальним і критичним дозам?

3. Не достатньо переконливо пояснюється, чому дози 3 та 21 Гр обумовлювали максимальний ефект активації сумарної транскрипції генів *AtKu70* та *AtRAD51* при одноразовому опроміненні, а проміжні дози 6 та 15 Гр – при повторюваному опроміненні.

4. Твердження «Відносно нижча радіочутливість властива апікальній меристемі» вимагає також пояснення, так як суперечить загальноприйнятій точці зору.

5. Давно доведено, що SOS-репарація – система індукцибельної репарації ДНК діє не тільки у бактерій, але й у інших організмах.

6. Думається, що слід було б висновок 2 винести на перше місце, як було б більш логічним розташувати відповідний йому розділ 4 дисертації перед розділом 3. А так з першого увідного і найбільшого висновку роботи не зрозуміло, про що йде мова, а, головне, кого чи що опромінювали. Це, відповідно, проявляється і в анотації.

Взагалі, розділ 4 виглядає якось сиротливо між 3 і 5 розділами. Це підкреслюється й тим, що складаючи 10% обсягу дисертації, йому відведено в авторефераті менше 2%.

Однак викладені зауваження та побажання не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Вважаю, що за обсягом, рівнем, актуальністю та науковим значенням виконаних досліджень і отриманих даних, обґрунтованістю наукових положень, рецензована дисертаційна робота «Зв'язок транскрипційної активності ключових генів репарації ДНК з пострадіаційним відновленням рослин» є завершеною науковою роботою, цілком відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету

Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор, Літвінов Сергій В'ячеславович заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.01 – радіобіологія.

Професор
кафедри радіобіології та радіоекології
Національного університету
біоресурсів і природокористування України
д.б.н., професор, академік НААН України
Заслужений діяч науки і техніки України


І.М. Гудков

Підпис І.М. Гудкова засвідчую
Начальник відділу кадрів НУБіП України




М.В. Михайліченко