

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Мармий Натальи Владимировны
на тему: «Биологическая роль 8-оксо-2'-дезоксигуанозина»
по специальности 03.03.05 – «Биология развития, эмбриология»

В клетках живых организмов в результате процессов метаболизма постоянно образуются активные формы кислорода (АФК), в малых концентрациях выполняющие физиологические, в том числе сигнально-регуляторные, функции. Под действием факторов окружающей среды (ионизирующие и неионизирующие излучения, токсины, ксенобиотики и др.) АФК могут образовываться в количествах, превышающих защитные возможности антиоксидантных и репарационных систем организма (окислительный стресс), что приводит к повреждению биомакромолекул. Известно более 30 продуктов окислительной модификации азотистых оснований нуклеиновых кислот, среди которых наиболее распространен и лучше других изучен 8-оксо-7,8-дигидрогуанин (8-охо-Gua). Впервые 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозин (8-охо-dG) был идентифицирован в начале 1980-х годов *in vitro* японскими исследователями, и за последующие 30 лет свойствам и роли 8-охо-dG в ДНК были посвящены тысячи публикаций. Гуанин в ДНК, обладая самым низким среди природных азотистых оснований окислительно-восстановительным потенциалом (1,29 мВ), легко окисляется в положении С8, образуя 8-охо-dG. ОВП последнего еще ниже (0,74 мВ), что приводит к его дальнейшему окислению до спироиминодигидантоина, иминоаллантаина, гуанидиногидантоина и т.п. Образование 8-охо-dG (и продуктов его модификации) является наиболее распространенным видом окислительного повреждения нуклеиновых кислот, а 8-охо-dG считается одним из основных биомаркеров окислительного стресса. Стационарный уровень 8-охо-dG в ядерной ДНК, согласно современным оценкам, составляет от 0,3 до 6 оснований на 10⁶ гуаниновых

остатков, а в митохондриальной ДНК – 10-30 основания на 10^6 G. Ежедневно в клетке образуется, в среднем, 10^5 остатков 8-охо-dG. Показано, что 8-охо-dG обладает мутагенными свойствами, при репликации ДНК образуя в *syn*-конформации некорректную пару 8-охо-dG:A, что приводит к трансверсии типа G→T. Поскольку окисление основания в 2'-дезоксигуанозине приводит к упрочнению гликозидной связи, необходима ферментативная репарация такого повреждения. Преимущественно, 8-охо-dG распознается в двуспиральной ДНК и выщепляется из нее высокоспецифичной 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой (OGG1) по механизму эксцизионной репарации оснований. Минорными путями репарации 8-охо-dG в ДНК являются эксцизионная репарация нуклеотидов (NER), репарация ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR), инцизионная репарация нуклеотидов (NIR) и коррекция ошибок спаривания (proof-reading) ДНК-полимеразами. Выщепленный из ДНК 8-охо-dG/8-охо-Gua попадает в кровь и далее с мочой выводится из организма. Среднее фоновое значение концентрации 8-охо-dG и 8-охо-Gua, определенное методом жидкостной хроматографии–тандемной масс-спектрометрии (LC–MS/MS) у взрослых здоровых людей, составляет в плазме крови 0,21 и 0,016 нг/мл, в слюне – 0,85 и 0,01 нг/мл, в моче – 12,2 и 3,8 нг/мл соответственно. Предполагается, что 8-охо-dG может играть важную регуляторную роль. Диссертационная работа Натальи Владимировны Мармий «Биологическая роль 8-оксо-2'-дезоксигуанозина» посвящена этому важному вопросу, безусловно является актуальной.

Диссертация написана по традиционной схеме. Состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, самих результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы. Список цитируемой литературы включает 165 ссылок.

В обзоре литературы, состоящем из четырех глав, представлены современные сведения о биологической роли 8-охо-dG. В первой главе

рассмотрены образование и репарация 8-оксо-2'-дезоксигуанозина. Приведена структура, показана распространенность 8-охо-dG в живой природе, рассмотрены возможные способы взаимодействия АФК с гуанином, приведена схем иллюстрирующая образование продуктов гипероксидации 8-охо-dG, детально рассмотрена репарация 8-охо-dG в ДНК, приведена схема иллюстрирующая связь 8-охо-dG с циркадными ритмами. В целом глава написана понятным языком, профессионально. Единственным вызывающим недоумение местом являются несколько абзацев с рассуждениями об АФК. Приведу ряд примеров. Автор пишет: «Синглетный кислород и супероксид-анион-радикал образуются на значительном удалении от ДНК и с очень высокой вероятностью прекращают свое существование, не добравшись до нее.» «Гидроксил-радикал..., в отличие от остальных АФК, может образоваться непосредственно в ядре, вблизи ДНК.» «Механизм переноса гидроксил-радикала с перекиси ненасыщенной жирной кислоты на dG» - вот такие сенсационные новости... Возможно я излишне строг, так как мои научные интересы лежат именно в этой области, но четкости в формулировании фраз явно не хватает.

Вторая глава называется «8-Охо-dG как биомаркер окислительного стресса и старения». В этой главе обобщен обширный материал о корреляции концентрации 8-охо-dG с возрастными процессами. Нужно отметить, что рассматриваются различные таксономические группы. Глава написана понятным языком. Некоторая информация была для меня новой.

Третья глава содержит данные о биологической роли 8-оксо-2'-дезоксигуанозина. Содержит три подглавы, первая посвящена участию исследуемого соединения в процессах мутагенеза. Вторая, регуляции уровней экспрессии генов, а также репарации ДНК. Третья, возможной сигнально-регуляторной роли производных гуанина.

Четвертая глава литературного обзора, посвящена предпосылкам и отправным точкам диссертационной работы. По-сути, таких предпосылок две. Во-первых, отсутствие экспериментальных доказательств влияния

свободного и/или экзогенного 8-охо-dG на эффективность репарации окислительного повреждения ДНК в живых клетках. Во-вторых, не однозначность роли свободный 8-охо-dG в нормальном развитии и старении клеток. Есть еще абзац, посвященный отгаданной, по моему мнению, загадке отличия содержания в ДНК 8-охо-dG у теплокровных и хладнокровных животных. В этом абзаце есть интересное предложение: «Например, для непойкилотермных организмов большую роль играет температура окружающей среды». Я всегда считал, что этот факт относится именно к пойкилотермным животным, впрочем вероятно это просто описка. Также в четвертой главе диссертант производит попытку объяснения применяемых моделей.

В главе посвященной методам исследований приведено описание используемых в диссертации методов и подходов. Используемые методы отвечают необходимым требованиям для решения поставленных задач. Изложены понятно и очень детально. После прочтения не остается явных вопросов.

В главе «Результаты и обсуждение» изложены полученные Н.В. Мармий результаты и проведен их анализ. Первая подглава посвящена разработанной диссертантом технологии получения 8-охо-dG в больших количествах. Технология позволяет довести выход 8-охо-dG из 8-бромо-2'-дезоксигуанозина до 80%. Считаю, что данное достижение является самым сильным и значимым для развития науки в целом. В настоящее время 1 мкг чистого 8-охо-dG стоит около 1000 рублей. По-сути, все работы, проводимые с 8-охо-dG, лимитированы его высокой ценой. Самостоятельный синтез 8-охо-dG занятие долгое и утомительное. Считаю, что технология разработанная Н.В. Мармий, при реализации коммерческими компаниями, окажет существенное влияние на всю область знаний, приведет к многократной интенсификации исследований.

Вторая подглава посвящена влиянию экзогенного 8-охо-dG на динамику накопления эндогенного окисленного нуклеозида в дрожжевых клетках

Saccharomyces cerevisiae. Показано, что экзогенный 8-охо-dG не влияет на рост суспензионной культуры дрожжей. Со временем содержание 8-охо-dG в их ДНК дрожжей увеличивается. С другой стороны экзогенный 8-охо-dG уменьшает накопление эндогенного 8-охо-dG в ДНК, интересно, но эффект 8-охо-dG более выражен при добавлении его во время стационарной фазы роста.

Следующие несколько подглав посвящены влиянию 8-охо-dG на *Drosophila melanogaster*. Установлено, что экзогенный 8-охо-dG влияет на личиночное развитие и метаморфоз плодовых мушек, повышает выживаемость личинок и имаго в условиях теплового шока, а также снижает уровень 8-охо-dG в ДНК после теплового воздействия. Интересно, что эффекты сильно отличаются у самок и самцов.

Отдельная глава посвящена изменению уровня 8-охо-dG в ДНК клеток печени после воздействия четыреххлористого углерода. Вся глава состоит из 135 слов. Полученные результаты не отражены в выводах, в ней не используется экзогенный 8-охо-dG. Необходимость ее включения в диссертацию осталась для меня не понятной.

Несколько глав посвящены влиянию 8-охо-dG на культуры трансформированных клеток китайского хомячка линии B11-dii FAF28. Наиболее сильным результатом, приведенным в этих главах, является способность экзогенного 8-охо-dG уменьшать количество данного окисленного основания в ДНК и высокомолекулярной РНК «старых» клеток китайского хомячка. При этом показано, что экзогенный 8-охо-dG не влияет на содержание окисленного основания в ДНК активно делящихся клеток.

В целом весьма существенным достоинством данной работы является гармоничное сочетание экспериментальных результатов с их детальным обсуждением. Существенных замечаний касающихся цели, задач и вывод нет. При общей положительной оценке работы необходимо отметить наличие небольшого числа погрешностей, некоторые из которых я упомянул выше. При этом они ни в коей мере не снижают ценности диссертации. По

фактической части диссертационной работы возникли следующие замечания дискуссионного характера:

1. На странице 63 диссертант пишет: «При этом особенно быстрое увеличение содержания 8-охо-dG наблюдалось в интервале 32–70 ч культивирования. Нужно отметить, что именно спустя 32 ч с момента посева мы фиксировали стабилизацию плотности культуры и прекращение ее роста». Тогда как из рисунка 10 следует, что прекращение роста культуры происходит примерно через 15 часов. Как диссертант это может прокомментировать?

2. Оценка среднего числа вылетевших имаго на пробирку на графиках 13 и 14 отличается в 2 раза. Были ли эти графики получены в одних и тех же условиях? Если нет, то с чем это связано?

3. На рисунке 20, показано, что примерно 40% самцов плодовых мушек не получавших 8-охо-dG в стадии имаго умирают в течение недели. В природе плодовые мушки тоже не получают 8-охо-dG, получается, что 40% гибнут и в природе? Автор предполагает, что за это явление несет ответственность накопленный в неволе генетический груз мутаций. Тогда насколько обоснованно использование именно такой модели в экспериментах?

4. В таблице 5 приведено сравнение продолжительности жизни самцов плодовых мушек. Медиана выживаемости приведена не правильно для групп k/k, охо/охо и охо/k. В таблица 6 медианы приведены не верно для групп k/k и охо/охо.

5. Общее замечание. Данные, на основе которых построены почти все графики, имеют ненормальное распределение. Не смотря на это диссертант оперирует средними значениями, а не медианами и стандартными ошибками среднего, а не квартилями или конфеденциальными интервалами.

6. Общее замечание. Следует отметить, что в работе получены новые и интересные результаты. Они опубликованы в 7 статьях, почти все в журналах про которые я не слышал. Хотелось бы пожелать, чтобы в будущем

полученные результаты публиковались в более известных, специализированных международных журналах.

Данные замечания не затрагивают основных положений диссертации и выводов работы. Все выводы работы хорошо обоснованы и не вызывают сомнений. Достоверности добавляет тот факт, что диссертант представил первичные данные. Основные результаты диссертационной работы прошли основательную апробацию. Они доложены на большом количестве конференций различного уровня, изложены в 7 статьях из списка ВАК, 4 – из них – из списка рекомендованных для защиты в диссертационных советах МГУ. Содержание автореферата соответствует диссертационной работе и опубликованным материалам. В целом работа Н.В. Мармий является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для соответствующей отрасли знаний.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.03.05 – «Биология развития, эмбриология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Мармий Наталья Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.05 – Биология развития, эмбриология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,

ведущий научный сотрудник лаборатории макрокинетики неравновесных процессов

НЦВИ ФГБУН Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН,

Гудков Сергей Владимирович

05.02.2018

Контактные данные:

тел.: +7 499 135 82 34,

e-mail: wrc@kapella.gpi.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация: «Механизмы образования активных форм кислорода под влиянием физических факторов и их генотоксическое действие»

03.01.02 - Биофизика (биол. науки)

Адрес места работы:

19991, Москва, ул. Вавилова, д. 38., 1.

НЦВИ ФГБУН Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН,

тел.: +7 499 135 82 34

e-mail: wrc@kapella.gpi.ru

Подпись сотрудника НЦВИ ФГБУН Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, С.В. Гудкова удостоверяю:

