

## ОТЗЫВ

### официального оппонента

на диссертационную работу Смирновой Светланы Владимировны:

«Влияние дейтерия на генотоксические эффекты химических соединений в клетках

*Escherichia coli*» представляемую на соискание ученой степени кандидата

биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика

Диссертационная работа Смирновой С.В. посвящена изучению влияния дейтерия на генетические процессы в клетке *E. coli*, а именно изучению влияния дейтерирования на индуцибельные процессы, обусловленные уровнем повреждения ДНК. В работе исследуется модифицирующий эффект дейтерия на индуцирующее SOS-ответ действие генотоксикантов и на активацию экспрессии *ada*-регулона в ответ на повреждение ДНК алкилирующими соединениями.

Тяжелая вода (оксид дейтерия, D<sub>2</sub>O) широко применяется в промышленности, биологии и медицине. Способность оксида дейтерия замедлять нейтроны повсеместно используется в производстве ядерной энергии, в качестве теплоносителя и замедлителя в тяжеловодородном ядерном реакторе.

В медицине дейтерированные соединения находят применение в двух аспектах. Первый связан с использованием дейтерированных субстанций для диагностических целей и для количественного анализа биологических материалов (например, кровь, моча или желчь) методами хромато-масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Дейтерированные органические соединения могут быть обнаружены с высокой чувствительностью различными методами, в том числе с помощью масс-спектрометрии. Благодаря этому, а также низкой токсичности дейтерированных соединений (по сравнению с радиоактивными), такие препараты, как и D<sub>2</sub>O, широко используются в исследованиях обмена веществ и действия лекарственных препаратов у людей и животных. Кроме того, ежегодно увеличивается количество дейтерированных лекарств. Разрыв C-H (углерод-водородных) связей является общей особенностью метаболизма лекарственных препаратов. Аналогичная дейтериевая связь C-D устойчивее в 10 раз. Эта особенность широко используется при создании фармпрепаратов. Дейтерирование приводит к изменению фармакокинетики за счет снижения метаболизма и при сохранении фармакологических свойств препарата позволяет уменьшить его дозу. А также снижает токсичность, уменьшая образование токсичных метаболитов. Примером такого лекарственного средства является дейтетрабенназин (d6-тетрабенназин), одобренный Food and Drug Administration (FDA) в 2017 г. Исходный тетрабенназин был разработан для



уменьшения тяжести симптомов болезни Хантингтона. Дейтерирование этого препарата позволило снизить дозу в два раза по сравнению с исходным соединением, что привело к снижению числа суточных введений. Первая регистрация дейтерированного препарата – знаковое событие для нового направления фармации. В настоящее время ожидается регистрация ещё более 10 дейтерированных лекарств. Замена водорода на дейтерий влияет на транспорт и проникновение лекарственных препаратов, улучшая их поступление в необходимые ткани. Может влиять на устойчивость лекарственных средств к их инактивации. В этой связи крупнейшими мировыми фармкомпаниями проводятся разработки и испытания дейтерированных препаратов, которые демонстрируют большую эффективность по сравнению с противными аналогами

Второй аспект связан с возрастанием изотопного эффекта в процессах с участием известных фармацевтических субстанций в водных растворах с соотношением дейтерий/протий (D/H) ниже или выше природного. Показано, что дейтерий можно отнести к эссенциальным микроэлементам. Содержание дейтерия в организме «условного» человека (массой 70 кг) составляет около 1 г, что при ранжировании необходимых микроэлементов соответствует его позиции между медью (100 мг) и цинком (2 г) и на 2–3 порядка выше по сравнению с Co, Mn, Mo. Это позволяет прогнозировать его участие в биохимических процессах в организме. Дефицит и избыток этого изотопа водорода может нарушать гомеостаз и смещать равновесия обратимых процессов в организме. К настоящему времени накопилось много исследований свойств воды, обедненной по дейтерию, и использованию ее в качестве адьювантного средства в лечении рака.

Высокое содержание дейтерия в воде приводит к нарушению многих биохимических процессов и проявляет токсический эффект. Известно, что оксид дейтерия отрицательно влияет на рост многих микроорганизмов, особенно эукариотических. Оксид дейтерия в высоких концентрациях частично подавлял синтез белков и нуклеиновых кислот, изменял клеточную морфологию и нарушал деление клеток. У млекопитающих (мыши, крысы, собаки) приводил к стерильности, острым неврологическим симптомам, гиперплазии печени и анемии. Рыбы, головастики, плоские черви не способны были выжить в среде с высоким содержанием оксида дейтерия. Однако микроорганизмы могут адаптироваться к жизни в среде с содержанием D<sub>2</sub>O до 98%, что позволяет получить дейтерированные вещества для медико-биологических целей.

Несмотря на обилие работ по изучению влияния дейтерия на многие биохимические процессы в клетках живых организмов, почти отсутствуют работы по изучению влияния дейтерия на генетические процессы. Таким образом, выбранное в диссертационной работе



направление исследований актуально как для решения прикладных, так и теоретических задач.

Выбор диссертантом методического подхода с использованием измерения люминесценции и оценкой уровня индукции SOS-ответа у бактерий во многом решил эту проблему. Могу отметить также удачный выбор серии модельных репортерных систем *Escherichia coli*, у которых хорошо изучена генетическая регуляция, что позволяет автору точно интерпретировать наблюдаемые в экспериментах изменения, связанные с присутствием избытка дейтерия в среде. Следует отметить обоснованный выбор достаточно широкого круга использованных генотоксикантов из групп с выраженной нацеленностью на участие в различающихся по характеру взаимодействиях с ДНК.

Диссертация включает в себя следующие главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Раздел «Введение» полностью соответствует названию и содержанию работы, а также включает информацию необходимую для понимания поднимаемых в диссертационной работе вопросов.

Глава «Обзор литературы» посвящена анализу современного состояния исследований влияния оксида дейтерия на живые организмы. Подробно рассматриваются изотопные эффекты, влияние дейтерия на биологические системы, результаты применения в фармакологии дейтерированных субстанций. Отмечается, что лекарственные препараты, метаболиты которых являются токсичными, в результате дейтерирования могут снизить эту токсичность за счет снижения метаболизма. Некоторые дейтерированные противомикробные препараты менее восприимчивы к разрушению микроорганизмами и, следовательно, являются более эффективными. Так же подробно рассматриваются механизмы SOS-ответа у *Escherichia coli*, роль участия в этом процессе генов *recA*, *dinI* и генов колицина *cda* и *cdi*, которые образуют оперон в плазмиде pColD. Отдельно рассматривается строение и механизм действия *ada*-регулона. Метилирование N-Ada домена приводит к повышению аффинности к промоторным участкам *ada*-регулона и превращает его в сильный транскрипционный активатор. Проведён анализ применения lux-биосенсоров для оценки генотоксичности химических соединений, в котором показано, что батарея из биосенсоров *Escherichia coli* может быть полноценной тест-системой для первичной оценки потенциальной мутагенности химических соединений и заменит в этом тест Эймса *Salmonella*/микросомы.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны экспериментальные методики и подходы, используемые для реализации поставленных в рамках диссертационной работы задач. В работе использованы 4 lux-биосенсора: *E. coli* MG1655 (pRecA::lux), *E. coli* MG1655



(pColD::lux), *E. coli* MG1655 (pDinI::lux) и *E. coli* MG1655 (pAlkA::lux) (обозначенные в диссертации как PRecA, PColD, PDinI и PAlkA, соответственно). Данные штаммы содержат гибридные плазмиды, несущие luxCDABE оперон фотобактерии *Photorhabdus luminescens*, поставленный под контроль промоторов генов *recA*, *cda* (*colD*), *dinI* и *alkA*.

С целью получения дополнительного доказательства влияния D<sub>2</sub>O на транскрипцию *ada*-регулона проведено исследование экспрессии хромосомных генов *alkA* и *ada*, входящих в *ada*-регулон *E. coli*, и плазмидного гена *luxA*, находящегося под контролем промотора гена *alkA*, с помощью метода ОТ-ПЦР. Для сравнительного изучения индукции *ada*-регулона в дейтерированных и в недейтерированных (контрольных) культурах *E. coli* использовали биосенсор *E. coli* K12 MG1655 (pAlkA-lux), люминесцирующий в результате активации промотора гена *alkA* в ответ на алкилирование ДНК.

В главе «Результаты и обсуждение» представлены и обсуждены новые для науки данные исследования воздействия D<sub>2</sub>O на эффект 17 генотоксикантов, различных по механизму действия на ДНК: 1). Дейтерирование клеток повышает ДНК-повреждающую активность 4-НХО, НММ, митомицина С, фурацилина, цис-платины, налидиксовой кислоты и 2-аминопурина в бактериальных клетках. 2). Дейтерирование клеток *E. coli* усиливает действие алкилирующих соединений: метилметансульфоната, N-нитрозо-N-метилмочевины и стрептозотоцина. 3). D<sub>2</sub>O увеличивает бактерицидное действие 4-НХО, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и УФ-облучения на клетках *E. coli*.

В целом, из 17 протестированных веществ 8 были наиболее эффективными в индукции экспрессии колицинового гена *cda*, о чем свидетельствовали наибольшие амплитуды ответа на биосенсоре *E. coli* (pColD-lux) на генотоксиканты: митомицин С, диоксидин, 4-НХО, ципрофлоксацин, ММС, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 9АА, УФ. Наиболее эффективно индуцировали SOS-ответ на всех трех штаммах *E. coli* (pRecA-lux), *E. coli*(pDinI-lux) и *E. coli*(pColD-lux) вещества, инициирующие свободнорадикальное окисление: диоксидин и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, алкилирующие вещества: НММ и ММС; а также, вызывающий аддукты 4-НХО и ведущий к образованию межнитевых и внутринитевых сшивок митомицин С. Максимальную амплитуду ответа биосенсора *E. coli* (pAlkA-lux) наблюдали в ответ на индукцию экспрессии *ada*-регулона НММ.

Методом ОТ-ПЦР показано, что референсный ген *rss* начинает экспрессироваться на 22-25 циклах, тогда как исследуемые гены на 30-35 циклах в случае дейтерированных, и 35-39 циклах в случае недейтерированных бактерий. Все эти данные указывают на усиливающее действие дейтерия (7,5% D<sub>2</sub>O) на экспрессию генов *ada*-регулона *E. coli*, индуцированную алкилирующим агентом ММС, и подтверждают результаты, полученные путем измерения люминесценции биосенсора *E. coli* K12 MG1655 (pAlkA-lux).



Следует отметить, что эксперименты без предварительного дейтерирования бактерий в течение 90 мин, т.е. в течение примерно 3-х циклов клеточного деления, в процессе которых может происходить замещение протия на дейтерий в *de novo* синтезированных белках и нуклеиновых кислотах, не показали значимого повышения активности генотоксикантов.

Смирнова С.В. логично и обоснованно интерпретирует собственные данные. Выводы диссертационной работы выглядят достоверными и естественно вытекают из полученных результатов.

По теме диссертационной работы опубликованы 8 статей в рецензируемых журналах, входящих в Перечень научных изданий, рекомендованных ВАК РФ. Результаты диссертационной работы представлены на международных научных конференциях. Автореферат полностью отражают содержание диссертации.

Диссертация хорошо написана и оформлена.

Принципиальных замечаний к данной работе у меня нет. Есть лишь некоторые технические замечания/пожелания и вопрос, скорее философского характера:

1. В литобзоре, на мой взгляд, следовало бы выделить в отдельную подглаву работы, посвященные молекулярным механизмам взаимодействия  $D_2O$  с биомолекулами и его влиянию на работу белков.

2. Рисунок 1 не информативен, т.к. дает представление о патентах только до 2014 года. Следовало или не приводить его, или дополнить своим патентным поиском по последнему десятилетию, это не сложно.

3. Имеются опечатки, например: *Photorhabdus phospherium* – это неправильно, очевидно, по нижеприведенной иллюстрации, что имелись в виду бактерии *Photobacterium phosphoreum*; родовые названия встречаются целиком в тексте по несколько раз, например, тот же *Photorhabdus* – четыре раза; в ссылках, также, как и в основном тексте, родовое и видовое названия следует писать наклонно; и т.д.

4. В табличках с результатами модифицирующего действия дейтерия на генотоксиканты хотелось бы видеть стандартное отклонение.

5. Рисунок 14 по влиянию дейтерирования на активацию *alkA* промотора выглядит очень наглядно, жаль, что автор решил не ставить его в автореферат.

6. Несмотря на внушительные эффекты влияния дейтерирования на ДНК-тропное воздействие ряда веществ, автор не делает вывода о перспективности данного направления в онкологии, даже в виде предположения в заключении к диссертации. Почему?

Высказанные замечания не снижают высокой оценки работы.



Диссертационная работа Смирновой С.В. на тему «Влияние дейтерия на генотоксические эффекты химических соединений в клетках *Escherichia coli*» представляет собой законченное научное исследование, которое по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости соответствует критериям пп.9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013г. № 842, с изменениями в Постановлении Правительства от 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. №650, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. №1539, от 26.09.2022 г. № 1690, а её автор Смирнова Светлана Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика.

**Официальный оппонент**

доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной генетики, заместитель заведующего кафедрой биофизики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

МАНУХОВ Илья Владимирович

Дата

06.12.2023

Контактные данные: Адрес: 141700, Московская обл., г. Долгопрудный, ул. Первомайская, д. 3, Корпус прикладной математики, 204.

Тел: моб. +7(905)562-29-24; +7 (495) 408-45-54

E-mail: manukhovi@mail.ru; info@mipt.ru

www.mipt.ru

Подпись доктора биологических наук, главного научного сотрудника, заведующего лабораторией молекулярной генетики, заместителя заведующего кафедры биофизики Манухова Ильи Владимировича удостоверяю:

Учёный секретарь МФТИ



Евсеев Евгений Григорьевич