

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Шпаковского Г.В.

на диссертационную работу Федяевой Анны Валерьевны

«Продукция активных форм кислорода и митохондриальный мембранный потенциал при температурном воздействии в клетках растений и дрожжей»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Одной из важнейших реакций организма практически на любое стрессовое воздействие является усиление генерации активных форм кислорода (АФК), которое в растительных клетках происходит за счёт активации различных оксидаз (таких как НАДФН-оксидазы, пероксидазы, аминоксидаза и др.), а также в результате функционирования хлоропластов, пероксисом и митохондрий. Увеличение содержания АФК в клетках растений наблюдается и при повышении температуры, однако вклад митохондрий в этот процесс, а тем более механизмы производства АФК в растительных митохондриях и трансдукция сигнала, приводящего к активации экспрессии белков теплового шока, всё ещё недостаточно изучены. В то же время, понимание причин, в результате которых образуются АФК в митохондриях и факторов, влияющих на этот процесс, может помочь найти эффективные меры для защиты растений от неблагоприятного эффекта чрезмерного образования АФК в условиях стресса. В этой связи можно утверждать, что тема диссертационной работы А.В. Федяевой, посвящённой изучению влияния различных (умеренных и сильных) температурных воздействий на изменение митохондриального мембранного потенциала и продукцию активных форм кислорода в клетках растений и дрожжей, представляется актуальной и значимой с чисто научной и практической точек зрения.

Диссертационная работа построена по традиционному плану и включает следующие разделы: список сокращений и основных обозначений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список использованной литературы. Объем диссертации – 158 страниц, в ней имеется 35 рисунков, список цитируемой литературы включает 201 источник. Во введении (5 стр.) автор обосновывает актуальность и научную ценность работы, формулирует цель и задачи исследования, его теоретическую и практическую значимость.

Обзор литературы (35 стр.) не имеет обобщающего названия и состоит из 7 разделов (1.1.–1.7.). Он посвящён анализу, прежде всего, таких тесно связанных с темой диссертации проблем, как влияние температурных воздействий на клетки растений и механизмы формирования ответных реакций на эти стрессовые воздействия в различных органеллах и компартментах растительных клеток. Обсуждаются пути генерации различных активных форм кислорода, классификация этих форм и разнообразные места их продукции в живой клетке (участки расположения соответствующих ферментных систем, основные органеллы), способы активации синтеза белков теплового шока (БТШ) при различных изменениях температуры. Особое внимание уделено подробной характеристике компонентов дыхательной цепи митохондрий (комплексы I–IV) и альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ, обсуждению взаимосвязи между продукцией АФК и мембранным потенциалом митохондрий.

Обзор литературы грамотно составлен, хорошо структурирован и ясно изложен, он свидетельствует о хорошей осведомленности автора в современном состоянии знаний по этим проблемам. Как отмечалось выше, содержание обзора литературы напрямую связано с темой собственных исследований диссертанта, так что данный раздел диссертации даёт читателю хорошее основание для оценки места исследований, проведённых автором, в общей системе знаний о способах генерирования активных форм кислорода митохондриями растений, дрожжей и животных в нормальных и стрессовых условиях.

Однако к этой части работы можно высказать ряд замечаний. Первое из них заключается в том, что обзор, к сожалению, никак не иллюстрирован – в нём полностью отсутствуют рисунки, хотя некоторые из них просто напрашиваются. Так, например, текст обзора только бы выиграл, если рисунками, таблицами или попросту наглядными схемами были бы, например, проиллюстрированы общие структуры ферментных комплексов I–V дыхательной цепи и их расположение в составе митохондрий, предполагаемые схемы переноса электронов в этих окислительно-восстановительных системах, реакции и пути образования обсуждаемых основных форм АФК. Такого рода иллюстрации, несомненно, улучшили бы восприятие материала читателем.

В тексте обзора есть и ряд стилистических погрешностей: «Впервые изучение ... началось» (стр. 13, второй абзац), «промоторные *регионы* генов» (стр. 16, в конце), «*лестница*» ДНК (стр. 22, в конце), расположение слова «*соответственно*» в

предложении по нормам скорее английского, а не русского языка (стр. 15, конец третьего абзаца).

Однако моё главное и серьёзное замечание, как к обзору, так и ко всей диссертации состоит в том, что очень странным, «гибридным» образом составлен СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ (стр. 137–158): хотя в тексте диссертации все работы цитируются по первому автору и году публикации, в этом списке 8 из 23 русскоязычных и 65 из 178 англоязычных публикаций приводятся почему-то по названиям статей... Это приводит к невозможности точной идентификации целого ряда ссылок (например, Tsiatsiani et al., 2011 или Cirsu, Aw, 2010) и неизбежной путанице – читатель вовсе не обязан проводить поистине детективную работу по точному нахождению более трети всех ссылок в библиографических источниках!.. Кроме того, по крайней мере, в трёх местах (положения ссылок 26 и 27, 188–190, 194 и 195) алфавитный порядок размещения ссылок не соблюдается.

Раздел «Материалы и методы» (9 стр.) свидетельствует о высоком методическом уровне работы. В нём даётся полное представление о большом наборе использованных биохимических, физиологических и инструментальных (флуоресцентная микроскопия) методов. Все экспериментальные методики написаны чётко и достаточно подробно, так что могут быть легко воспроизведены.

Хорошее впечатление производят основные (как по объёму, так и по содержанию) разделы диссертации: «Результаты» (Глава 3, разделы 3.1–3.2, 59 стр.) и «Обсуждение» (Глава 4, разделы 4.1–4.8, 17 стр.). В этих разделах диссертант излагает полученные результаты и обобщает их. Раздел «Результаты» прекрасно иллюстрирован (35 рисунков), так что полученные экспериментальные данные, всесторонне проанализированные в разделе «Обсуждение», сомнений не вызывают.

Экспериментальная работа проводилась А.В. Федяевой по следующим основным направлениям:

1. Анализ изменения содержания АФК в клетках сахарного тростника, озимой пшеницы и дрожжей при температурном воздействии различной интенсивности.
2. Изучение роли митохондрий в генерации АФК в гетеротрофных клетках растений и дрожжей в условиях температурного стресса.
3. Проверка возможной взаимосвязи между изменениями митохондриального мембранного потенциала и кальциевого гомеостаза клетки и уровнем АФК в клетках растений и дрожжей при тепловом воздействии.

К решению всех поставленных задач диссертант подошел очень основательно и комплексно, всесторонне исследовав влияние умеренных и жёстких температурных воздействий на изменение содержания АФК в гетеротрофных культурах клеток озимой пшеницы и сахарного тростника, а также в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, продемонстрировав важную роль митохондрий в генерации АФК в этих клеточных системах при повышении температуры и выяснив взаимосвязь изменений митохондриального мембранного потенциала и кальциевого гомеостаза с уровнем АФК в клетках растений и дрожжей при тепловом воздействии.

По результатам, полученным на клетках дрожжей, имеется следующий вопрос. При изучении влияния протонофора СССР на жизнеспособность этих клеток показано, что при температуре в 45°C добавление СССР защищало клетки дрожжей от гибели только при использовании низкой (0,5 мкМ) концентрации протонофора, в то время как при использовании более высоких концентраций СССР (1 и 2 мкМ) протекторного эффекта не наблюдалось. Как автор объясняет эти данные?

Описание экспериментов и обсуждение полученных результатов свидетельствует, что мы имеем дело с вполне сформировавшимся, квалифицированным исследователем и научным работником.

Из наиболее интересных результатов можно отметить следующие.

1. Автором впервые показано, что митохондрии являются одним из основных источников АФК при умеренном повышении температуры в гетеротрофной культуре клеток растений.

2. Обнаружена причинно-следственная связь между усилением продукции АФК на ранней стадии теплового воздействия и зависимой от гомеостаза внутриклеточного кальция гиперполяризацией митохондриальной мембраны.

Практическое значение работы А.В. Федяевой состоит в том, что полученные ею данные о путях и механизмах генерирования активных форм кислорода (АФК) при тепловом воздействии могут быть полезными для поиска новых способов защиты растений в стрессовых условиях.

К разделам «Результаты» и «Обсуждения» у меня имеется небольшое дополнение, которое следует рассматривать не как замечание, а скорее пожелание на будущее. Данные последних лет показывают, что у растений существует явная координация в передаче ретроградных сигналов генной регуляции на стресс от энергопродуцирующих органелл (хлоропластов и митохондрий) к ядру клетки, во многом определяемая

изменением окислительно-восстановительных потенциалов и уровнем генерации АФК (метаболиты, синтезируемые на стресс, у органелл могут отличаться). Среди ядерных транскрипционных факторов, воспринимающих и реализующих отмеченные выше оперативные сигналы, идентифицирован, по крайней мере, один (ABI4, ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4) общий для ретроградных систем и хлоропластов, и митохондрий – он регулирует, в частности, экспрессию гена *AOX1a* альтернативной оксидазы и ряд других «стрессовых» генов митохондрий, локализованных в ядре клетки (Science, 2007, 316: 715–719; Plant Physiol., 2009, 150: 1286–1296; Plant Cell, 2013, 25: 3450–3471). Поскольку генерация АФК, в том числе и на температурный стресс, происходит в значительной степени и в хлоропластах, наверное, в диссертации стоило бы упомянуть о такой кооперации в передаче ретроградных сигналов от обоих типов энергопродуцирующих органелл растительной клетки.

Выводы работы (1 стр.), представленные сразу за кратким Заключением (4 стр.), сформулированы чётко и адекватны полученным результатам.

Как уже отмечалось выше, главным недостатком работы является странным образом составленный Список использованной литературы. Приведённые выше другие замечания и пожелания несколько не снижают в целом высокий научный уровень работы Анны Валерьевны Федяевой.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Выводы соответствуют полученным в работе результатам и поставленным задачам. Все данные диссертации опубликованы, в том числе в ведущих отечественных (Биохимия, Генетика, Журнал стресс-физиологии и биохимии) и добротных международных (Protoplasma) журналах, рекомендованных ВАК, а также были представлены на всероссийских и международных конференциях.

Диссертационная работа Федяевой А.В. «Продукция активных форм кислорода и митохондриальный мембранный потенциал при температурном воздействии в клетках растений и дрожжей», является законченным научно-квалификационным исследованием и вполне соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., предъявляемым ВАК Минобрнауки России к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук. Федяева Анна Валерьевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Результаты работы могут быть использованы в курсах лекций по биохимии, экологии и физиологии растений на соответствующих кафедрах университетов нашей страны, а также в исследовательской работе в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ФГБУН Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ФГБОУ ВПО Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова.

15 мая 2015 г.

/ Г.В. Шпаковский /

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО) России
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)
Адрес: 117997 Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая 16/10

Шпаковский Георгий Вячеславович,
Заведующий лабораторией механизмов генной экспрессии ИБХ РАН,
доктор биологических наук по специальности 03.00.03 – молекулярная биология,
старший научный сотрудник, тел. +7(495)3306583, факс: +7(495)3357103,
E-mail: gvs@ibch.ru

Подпись Г.В. Шпаковского удостоверяю:

Учёный секретарь ИБХ РАН
д. ф-м. н.



/ В.А. Олейников /