

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор федерального  
государственного бюджетного  
образовательного  
учреждения высшего  
профессионального образования  
«Воронежский государственный  
университет, д.э.н., профессор



Д.А. Ендовицкий

«15» 05 2015 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

**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**

#### **Актуальность темы исследования**

Продукция активных форм кислорода (АФК) является центральным звеном в ответе эукариотической клетки на внешнее воздействие. В зависимости от условий АФК могут либо индуцировать в организме защитные механизмы, либо, наоборот, активировать процесс клеточной гибели. Изучение механизма этого явления при тепловом воздействии на таком хозяйственно важном объекте, как пшеница, имеет большое практическое значение. Повышение температуры в летний период является одним из основных факторов, снижающих урожайность зерновых культур. Вместе с тем, в диссертации подняты и важные теоретические вопросы. Достаточно давно с использованием изолированных митохондрий было показано, что в ряде случаев повышение митохондриального мембранного потенциала (ММП) стимулирует продукцию АФК. Однако наблюдается ли такое явление на организменном уровне при стрессовом воздействии, например, при повышении температуры ранее не исследовалось. Использование в качестве объекта исследования *Triticum aestivum* L. удачно дополняется применением такого простого и генетически изученного организма как *Saccharomyces cerevisiae*.

Использование дрожжей позволяет «включать» и «выключать» митохондрий, что дает возможность получать прямые ответы на поставленные в работе вопросы. Поэтому диссертационная работа Федяевой А.В., посвященная зависимости между митохондриальным мембранным потенциалом и продукцией АФК представляется актуальной и оригинальной.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа А.В. Федяевой изложена на 158 страницах машинописного текста. Состоит из списка сокращений и основных обозначений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения и списка использованной литературы. Экспериментальные данные проиллюстрированы 35 рисунками. Список использованной литературы включает 201 источник, в том числе 23 публикации на русском языке и 178 на английском.

Во *«Введении»* автор обосновывает актуальность заявленной темы исследования, формулирует цель работы, которая звучит как «изучение взаимосвязи между изменением митохондриального мембранного потенциала, продукцией АФК, кальциевым гомеостазом, жизнеспособностью клеток растений и дрожжей при температурном воздействии», а также основные задачи исследования и научное положение, выносимые на защиту. В этом разделе отражена научная новизна работы, теоретическая и практическая значимость.

Глава *«Обзор литературы»* отличается конкретностью и глубоким анализом имеющихся в научной литературе данных, которые соответствуют теме диссертационной работы. Освещены такие вопросы как 1) ответные реакции клеток растений на температурное воздействие растений; 2) синтез белков теплового шока (БТШ) при повышении температуры; 3) роль активных форм кислорода в активации экспрессии БТШ; 4) механизмы гибели клеток и роль АФК в этих процессах; 5) механизм образования АФК. Информативно и познавательно представлен материал о типах АФК и сайтах их продукции в клетке, об участии отдельных комплексов электрон-транспортной цепи митохондрий и альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ в образовании активных форм кислорода. (Эту часть обзора можно рекомендовать автору оформить в виде публикации). Особое место в обзоре уделяется связи между изменениями митохондриального мембранного потенциала (ММП) на внутренней мембране митохондрий и содержанием АФК. Приведены конкретные литературные данные, указывающие, что зависимость между генерацией АФК и ММП не однозначна - усиление генерации АФК может происходить как при снижении потенциала, так и при его повышении.

Анализ научных литературных данных позволил заключить, что в клетках растений при тепловом воздействии зависимость между митохондриальной генерацией АФК и ММП при тепловом воздействии не изучена.

В главе «*Материалы и методы*» приводится описание объектов и методов исследования и условий температурного воздействия, которые были использованы в работе. В качестве объектов исследования были использованы суспензионные культуры озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорта Иркутская) и сахарного тростника (*Saccharum officinarum* L.), а также клетки дрожжей - штамм родительского типа *Saccharomyces cerevisiae* W303-1В и изогенный ему мутант *petite* (мутант дыхательной недостаточности). Использование в работе клеток дрожжей *S. cerevisiae* и их *petite* мутантов, у которых отсутствует митохондриальная ДНК, для изучения роли митохондрий в образовании АФК, без сомнения, является обоснованным. Гетеротрофные клеточные культуры растений, в которых, как известно, основной источник АФК фотосинтезирующей клетки – хлоропласты отсутствуют – также использованы достаточно адекватно по отношению к изучению вклада митохондрий в продукцию АФК.

Методы выращивания суспензионных культур клеток растений и дрожжей, электрофоретический анализ белков, определение жизнеспособности клеток растений с использованием двойного окрашивания флуоресцентными красителями и ряд других методов общеприняты.

Основной метод исследования, при помощи которого получена значительная часть фактического материала, это метод флуоресцентной микроскопии. Использование данного метода обосновано тщательно подобранными условиями эксперимента, использованием в работе разобщителей процессов окисления и фосфорилирования и известных анти- и прооксидантов.

Таким образом, можно заключить, что хороший научно-методологический уровень исследования обеспечил автору диссертации получение большого по объему экспериментального и достоверного материала.

Полученные в работе данные приводятся в главе «*Результаты*» и представлены двумя блоками: «*Ответная реакция на стрессовое воздействие у клеток растений*» и «*Ответная реакция на стрессовое воздействие у клеток дрожжей*».

Показано, что накопление ряда БТШ при тепловом стрессе у изучаемых культур отличается и происходит в рамках определенных диапазонов повышенных температур. Соответственно, образование АФК наблюдалось также при характерном для каждого вида диапазоне. В работе показано, что тепловое воздействие вызывает повышение митохондриального мембранного потенциала (ММП) в клетках дрожжей и растений. Причем в клетках озимой пшеницы наблюдалась высокая корреляционная зависимость между ММП и уровнем АФК. В клетках же сахарного тростника такая корреляция наблюдалась только на ранних этапах теплового воздействия. На более поздних

этапах происходило снижение ММП на фоне повышения уровня АФК. Чтобы непосредственно доказать связь между ММП и продукцией АФК автор использовал протонифоры, СССР и ДНФ, снижающие ММП. Оказалось, что добавление протонифоров подавляло повышение ММП и продукцию АФК при тепловом воздействии как в клетках растений, так и в клетках дрожжей. Далее непосредственно показано, что нарушение митохондриальных функций в результате мутации *petite* ингибирует и продукцию АФК, и повышение ММП. Показано, что повышение ММП при тепловом воздействии и усиление продукции АФК зависит от внутриклеточного кальциевого гомеостаза. Интересно, что повышение ММП и усиление продукции АФК в клетках пшеницы происходит не только при тепловом, но и холодном воздействии.

В главе «*Обсуждение*» автор обсуждает полученные данные в свете, имеющейся в литературе информации, которая логично переходит в раздел «*Заключение*», где диссертант кратко обобщает полученные результаты и предлагает гипотетическую последовательность событий, которые развиваются в клетке растений и дрожжей, при тепловом воздействии. Согласно предлагаемой схеме, на первом этапе теплового воздействия происходит кратковременное повышение уровня кальция в цитозоле, что, в свою очередь, вызывает повышение митохондриального мембранного потенциала (ММП). Повышение ММП приводит к перевосстановлению компонентов дыхательной цепи и усилению продукции АФК. На следующем этапе наблюдается снижение ММП в результате выхода из митохондрий цитохрома С, что также стимулирует продукцию АФК.

«*Выводы*» корректно сформулированы, соответствуют поставленной цели и задачам исследования и объективно отражают полученные экспериментальные данные и доказывают выносимое автором на защиту научное положение.

#### **Степень обоснованности научных положений и выводов**

Представленные в работе результаты и их обсуждение убедительно доказывают, что тепловое воздействие вызывает в клетках дрожжей усиление продукции АФК. Об этом свидетельствует повышение флуоресценции флуоресцентного красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (DCF), а также способность антиоксиданта аскорбиновой кислоты подавлять флуоресценцию DCF. Однако некоторое недоумение вызывает второе предложение вывода 1 «Продукция АФК не наблюдается при жестком тепловом воздействии». Нельзя исключать, что при жестком тепловом воздействии происходит инактивация эстераз, которые обуславливают флуоресценцию DCF.

Тесная зависимость между повышением митохондриального потенциала и продукцией АФК при тепловом воздействии, а также способность агентов и мутации *petite*, которые нарушают функционирование митохондрий, подавлять продукцию АФК при тепловом воздействии однозначно доказывают вывод 2 («Одним из основных источников АФК в гетеротрофных клетках растений и дрожжей в условиях теплового воздействия являются митохондрии»).

В работе показано, что наряду с повышением продукции АФК при тепловом воздействии в клетках растений наблюдается развитие отсроченной гибели, а также увеличение доли клеток с конденсированным протопластом. Кроме того, снижение продукции АФК в результате обработки антиоксидантом аскорбиновой кислотой или протонифорами эффективно защищает клетки дрожжей от гибели. Таким образом, убедительно доказано положение вывода 3, «Повышение продукции АФК является причиной гибели клеток растений и дрожжей при умеренном тепловом воздействии». Однако здесь остается некоторый вопрос. Продукцию АФК при тепловом воздействии у дрожжей подавляли как высокие, так и низкие концентрации протонифоров. Почему протонифоры хорошо защищали клетки дрожжей от гибели только в низких концентрациях, но не в высоких?

Положения вывода 4 «Повышение продукции АФК на ранней стадии теплового воздействия сопровождается гиперполяризацией внутренней митохондриальной мембраны. Полученные данные указывают, что продукция АФК при тепловом воздействии в значительной степени является следствием гиперполяризации митохондриальной мембраны» убедительно доказывается следующими результатами работы. Во-первых, в культуре клеток озимой пшеницы наблюдается высокая корреляционная зависимость между повышением митохондриального мембранного потенциала (ММП) и продукцией АФК при тепловом воздействии. Во-вторых, протонифоры, снижающие ММП, подавляют продукцию АФК как в клетках растений, так и в клетках дрожжей. В-третьих, мутация *petite*, приводящая к дисфункции митохондрий дрожжей, одновременно подавляет повышение ММП и продукцию АФК. И, в-четвертых, добавление ЭГТА и лантан хлорида, подавляет как повышение ММП в клетках озимой пшеницы при тепловом воздействии, так и усиление продукции АФК.

Зависимость между кальциевым гомеостазом, с одной стороны, и повышением ММП и усилением продукции АФК, с другой стороны, (Вывод 5) доказывается результатами, свидетельствующими, что подавление транспорта кальция через плазматическую мембрану в результате использования ЭГТА и лантан хлорида подавляет повышение ММП и усиление продукции АФК.

Таким образом, положение, выносимое автором на защиту, которое звучит как «Повышение генерации активных форм кислорода в клетках растений и дрожжей на ранней стадии теплового воздействия определяется повышением митохондриального мембранного потенциала и зависит от нарушений внутриклеточного кальциевого гомеостаза» не вызывает сомнений и полностью подтверждается, полученными в работе данными.

### **Значимость научных результатов**

#### *Научная новизна*

Окислительному стрессу как основному компоненту любого абиотического и биотического воздействия уделяется пристальное внимание в научной литературе. Хорошо известно, что хлоропласты, НАДФН-оксидазы, пероксисомы и связанные с клеточной стенкой пероксидазы могут генерировать АФК при стрессовом воздействии. К сожалению, эта заслуга, как правило, зарубежных авторов. В российской литературе, посвященной физиологии растений, к окислительному стрессу, зачастую, подходят как описательному явлению, не интересуясь механизмами его образования. В данной работе автор, основываясь на данных, полученных на изолированных митохондриях, которые указывали, что в определенных ситуациях продукция АФК митохондриальной электрон-транспортной цепью возрастает при повышении митохондриального мембранного потенциала, поставил перед собой цель исследовать, происходит ли данное явление в целом растении при тепловом воздействии. В результате выполнения работы А.В. Федяева получила убедительные доказательства, что на раннем этапе теплового воздействия митохондрии генерируют АФК в клетках растений и дрожжей именно в результате повышения митохондриального мембранного потенциала. Более того, продукция АФК и митохондриальный мембранный потенциал зависят от внутриклеточного кальциевого гомеостаза.

#### *Теоретическая и практическая значимость*

Результаты, полученные в работе, вносят значительный вклад в понимание механизмов, обуславливающих редокс-метаболизм митохондрий в клетках растений и дрожжей при стрессовом воздействии. Полученные результаты могут быть использованы в сельском хозяйстве для создания препаратов, снижающих окислительный стресс и, таким образом, повышающих урожайность пшеницы и других сельскохозяйственных культур.

#### *Рекомендации по использованию полученных результатов*

Материалы диссертации могут быть включены в курсы лекций по генетике, экологии и физиологии и биохимии растений в университетах, сельскохозяйственных и биотехнологических институтах и использоваться в профильных научно-исследовательских институтах РАН.

В процессе ознакомления с содержанием диссертационной работы и автореферата, подготовки отзыва и его обсуждения кроме замечаний и вопросов, отмеченных в тексте отзыва, имеется ряд следующих.

1. Несмотря на хорошее и грамотное оформление работы, тем не менее, иногда встречаются опечатки, повторение слов синонимов, в списке сокращений и основных обозначений наряду с англоязычными аббревиатурами используемых реагентов приведены и русскоязычные, например карбонилцианид *m*-хлорфенилгидразон (СССР) и 2,4-динитрофенол (ДНФ), единообразие уместнее. Способ цитирования литературных источников по тексту выбран неудачно. Это затрудняет работу с материалом диссертации.

2. В главе «Результаты» название раздела 3.1.5. (стр.77) «Изменение интенсивности флуоресценции FDA при действии повышенных температур у суспензионной культуры клеток озимой пшеницы» сформулировано неудачно. В данном случае, ведь FDA использовали, чтобы обосновать использование флуоресцентных красителей DCF и JC-1 при температурных воздействиях, адекватно ли интенсивность флуоресценции этих красителей в данных условиях экспериментов отражает изменения митохондриального потенциала и АФК?

3. Для характеристики типов гибели клеток в контексте программируемой клеточной смерти, хотя и с признаками этого типа гибели фактического материала: изучения выживаемости клеток и конденсации протопласта недостаточно. Необходимы биохимические и молекулярно генетические маркеры. Советуем автору продолжить работу в этой области исследования, это достаточно перспективно в отношении роли митохондрий в ответных реакциях организмов на стрессовые воздействия.

4. На рис. 33 показано, что при тепловом воздействии в клетках дрожжей *petite*-мутанта незначительно повышается продукция АФК. По какой причине произошло увеличение генерации АФК, если в клетках *petite*-мутанта нет полноценных митохондрий?

В целом, анализ представленного диссертантом материала свидетельствует об обоснованности и достоверности полученных автором результатов. Полученные результаты полностью отражают сделанные выводы и научное положение, выносимое на защиту. По материалам диссертации опубликовано 19 работ, из них 6 статей в научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Результаты исследований прошли апробацию на отечественных и международных конференциях.

Текст автореферата отражает основные результаты и выводы диссертационной работы, в нем показан вклад автора в проведенное исследование, а также степень новизны и практическая значимость результатов исследований.

## Заключение

Таким образом, диссертация А.В. Федяевой является законченным исследованием, выполненным на высоком научном уровне с применением современных методов и подходов. Диссертационная работа Федяевой Анны Валерьевны на тему «Продукция активных форм кислорода и митохондриальный мембранный потенциал при температурном воздействии в клетках растений и дрожжей» соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденному Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., предъявляемым ВАК Минобрнауки РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор – Федяева Анна Валерьевна – заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Диссертация и отзыв обсуждены и одобрены на заседании кафедры генетики, цитологии и биоинженерии ФГБОУ ВПО «ВГУ» (протокол №5 от 15 мая 2015 г.).

Зав. кафедрой генетики, цитологии  
и биоинженерии федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения  
высшего профессионального образования  
«Воронежский государственный университет»,  
д.б.н., профессор

В.Н. Попов

15 мая 2015 г.

Федеральное государственное  
бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
Воронежский государственный университет  
Адрес: 394006, г.Воронеж, Университетская пл., 1

Тел. (473)2207522, факс (473)2208755, E-mail office@vsu.ru



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВПО «ВГУ»)	
Подпись	<i>Попова В.Н.</i>
Заверяю	<i>без документов</i>
подпись, расшифровка подписи	<i>С.С. Селестин</i> должность <i>15.05.2015</i>