

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Тимофеева М.А.  
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**

Диссертационная работа Федяевой Анны Валерьевны направлена на исследование вклада митохондрий в общеклеточную генерацию активных форм кислорода (АФК), а также подтверждение регуляторной зависимости синтеза АФК от изменений электрохимического потенциала на внутренней митохондриальной мембране. Универсальной реакцией клеток на действие стрессового фактора является генерация АФК. Известно, что АФК образуются во многих клеточных компартментах. Однако вклад отдельных органелл в этот процесс, а также их триггерные механизмы, управляющие синтезом АФК, до сих пор полностью не расшифрованы.

Одним из перспективных подходов при изучении вклада митохондрий в продукцию АФК при температурном воздействии является использование в работе суспензионных гетеротрофных клеточных культур растений, в которых отсутствуют хлоропласты - основной источник АФК в фотосинтезирующей клетке, и клеток дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) двух штаммов, один из которых мутантный. Мутация затрагивает электрон-транспортную цепь митохондрий. Использование данных объектов исследования позволяет корректно оценить взаимосвязь между продукцией АФК митохондриями и изменением митохондриального потенциала при температурном воздействии.

В связи с этим диссертационная работа А.В. Федяевой, посвященная изучению взаимосвязи между изменением митохондриального мембранного потенциала, продукцией АФК, кальциевым гомеостазом и жизнеспособностью клеток растений и дрожжей при температурном воздействии, безусловно, является актуальным и оригинальным исследованием, важным для понимания вовлеченности митохондрий в ответную реакцию клетки на стрессовое воздействие.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

**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.

**Введение** Во введении автор обосновывает актуальность избранной темы исследования и подходы к ее решению, формулирует цель работы, основные задачи исследования и положение, выносимое на защиту.

**Обзор литературы** (стр. 13-47). Обзор научных сведений об изучаемом вопросе представлен и структурирован в соответствии с целью исследования и поставленными задачами. В нем изложены современные представления о реакциях организмов на изменение температуры. Рассмотрены такие ответные реакции растений, как синтез белков теплового шока (БТШ), генерация АФК, изменение функционирования органелл, программируемая клеточная гибель. Отдельное внимание уделено различным механизмам продукции АФК в клетке. Исследуя продукцию АФК митохондриями, автор приводит подробную информацию о структуре и функционировании отдельных компонентов электрон-транспортной цепи митохондрий. Заслуживает внимания часть обзора литературы, посвященная вкладу отдельных комплексов дыхательной цепи митохондрий в генерацию АФК. На основе проведенного анализа научных данных, сделан вывод, что механизм митохондриальной генерации АФК клетками растений и дрожжей при стрессовом воздействии *in situ* изучен недостаточно. В литературе также существуют противоречивые данные о связи между повышением митохондриального потенциала и усилением продукции АФК при тепловом воздействии. Это справедливое заключение и объясняет интерес диссертанта к выбранной теме исследования.

**Материалы и методы** диссертационной работы (стр. 48-56). В главе «Материалы и методы» дана характеристика объектов и методов исследования. Для проведения экспериментов автором были использованы современные и классические для растительных объектов методы исследования. Знакомство с материалом этой главы позволяет однозначно констатировать, что обоснованно подобраны объекты исследования, использование широкого спектра современных и корректных методов исследования и хороший научно-методологический уровень обеспечили получение диссертантом большого по объему экспериментального материала. Основным методом исследования, при помощи которого получена значительная часть фактического материала – метод флуоресцентной микроскопии. Этот метод удачно дополняется рядом других методов, включая определение количества белков методом вестерн-блоттинга, а также определение жизнеспособности.

Глава **Результаты** (стр. 57-115). Полученные в ходе проведенных экспериментов результаты отражают ответную реакцию на стрессовое воздействие у клеток растений и дрожжей. В качестве объектов исследования были использованы суспензионные культуры клеток озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорта Иркутская) и сахарного тростника (*Saccharum officinarum* L., сорта РОJ2878, линия, устойчивая к аноксии), различающиеся по теплолюбивости, а также клетки дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) двух штаммов, один из которых мутант *petite*.

При изучении ответной реакции клеток озимой пшеницы и сахарного тростника на тепловое воздействие было исследовано: содержание БТШ; уровень генерации АФК; изменение электрохимического потенциала на внутренней мембране митохондрий, изменение жизнеспособности клеток, также определена корреляция между увеличением генерации АФК в клетках и повышением митохондриального потенциала (МП) при тепловом воздействии. Также были проведены сравнительные эксперименты с применением холодового воздействия на растительные клетки. Для установления роли митохондрий в ответной реакции клетки на действие стресса были изучены изменения содержания АФК, значения МП и жизнеспособности клеток дрожжей *S. cerevisiae* с использованием мутанта *petite*. В клетках мутанта *petite* в результате утраты митохондриальной ДНК не функционирует электрон-транспортная цепь.

Подтверждено, что в гетеротрофной культуре клеток растений, а также у дрожжей *S. cerevisiae* одним из источников АФК при температурном воздействии являются митохондрии. Обнаружено, что повышение продукции АФК при умеренном тепловом воздействии определяет гибель клеток, которая имеет признаки программируемой клеточной гибели. Показано, что на ранней стадии теплового воздействия наблюдается гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны, которая зависит от гомеостаза внутриклеточного кальция. На более поздней стадии теплового воздействия происходит деполяризация митохондриальной мембраны. Обнаружена причинно-следственная связь между усилением продукции АФК на ранней стадии теплового воздействия и гиперполяризацией митохондриальной мембраны.

Поскольку в работе использованы как растительные, так и дрожжевые объекты, то полученные результаты свидетельствуют о том, что взаимосвязь между продукцией митохондриальных АФК и мембранным потенциалом митохондрий является универсальным явлением. На этом основании можно предполагать, что изучаемые в диссертации процессы и явления могут быть использованы в исследовании механизма митохондриальной продукции АФК у всех эукариотических организмов.

**Обсуждение** (стр. 116-132). В данном разделе с привлечением литературных сведений обсуждаются полученные результаты, их согласованность с данными других авторов, а также оригинальность собственных результатов. Обсуждение результатов

проведено в полной мере с привлечением как классической, так и современной научной литературы. Более того, в каждом подразделе обсуждаемых результатов приводится предварительное заключение, что послужило основой для выводов.

В разделе «**Заключение**» диссертант, кратко обобщая и обсуждая полученные в ходе исследования результаты в сравнении с имеющимися в научной литературе данными по изучаемому вопросу, предполагает последовательность событий, развивающихся в клетке, при тепловом воздействии. При этом, как полагает автор, усиление продукции АФК при тепловом воздействии либо активирует экспрессию БТШ, что приводит к развитию устойчивости клетки, либо индуцирует гибель. Митохондрии в данном процессе выступают как передатчик и реле кальциевого сигнала, модулируют уровень кальция в цитоплазме и, вероятно, в других клеточных органеллах, а также стимулируют продукцию АФК, что и определяет митохондриальную ретроградную регуляцию.

Завершают работу выводы, которые соответствуют поставленной цели и задачам исследования, аргументированы и объективно отражают полученные экспериментальные данные и доказывают выносимое автором на защиту научное положение.

Основные результаты диссертации изложены в 19 работах, из них 6 статей в научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Следует отметить, что большая часть экспериментальных данных диссертации опубликована в научных изданиях, которые цитируются в таких базах данных как РИНЦ, Scopus, Web of Science.

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.

#### ***Достоинства и недостатки по содержанию и оформлению работы***

Анализ представленного диссертантом материала свидетельствует об обоснованности и достоверности полученных автором результатов. Фактический материал хорошо иллюстрирован. Экспериментальная часть работы хорошо продумана и спланирована, для достижения цели работы использованы адекватные объекты изучения и современные физиолого-биохимические методы исследования. Диссертационная работа изложена хорошим научным языком, результаты представлены четко и последовательно, предопределяя следующие этапы работы, и в итоге позволяют заключить, что выносимое на защиту научное положение о том, что повышение генерации активных форм кислорода в клетках растений и дрожжей на ранней стадии теплового воздействия определяется повышением митохондриального

мембранного потенциала и зависит от внутриклеточного кальциевого гомеостаза, - обосновано и доказано.

Также следует подчеркнуть научную и практическую значимость проведенного исследования.

Научная новизна. Обнаружена прямая зависимость продукции АФК от уровня митохондриального потенциала. В гетеротрофных культурах клеток растений и дрожжей впервые показано, что при повышении температуры митохондрии являются одним из основных источников АФК. Показано, что при умеренном тепловом воздействии наблюдается гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны, которая при более длительном воздействии сменяется деполяризацией. Установлено, что процессы генерации митохондриального потенциала и АФК зависят от гомеостаза внутриклеточного кальция.

Теоретическая и практическая значимость. Известно, что увеличение содержания активных форм кислорода (АФК) является универсальной реакцией организма практически на любое стрессовое воздействие. Полученные данные о митохондриальной продукции АФК в гетеротрофных клетках растений и дрожжей при тепловом воздействии существенно расширяют знания о механизме образования АФК в клетках эукариот при стрессовых воздействиях.

Понимание причин и факторов, приводящих к образованию активных форм кислорода, одних из главных соединений, участвующих в повреждении и гибели как растительных, так и животных клеток, необходимо для нахождения эффективных мер для защиты растений и животных от неблагоприятного эффекта чрезмерного образования АФК.

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

### ***Замечания***

Как и любая подобная работа, представленная диссертация не лишена некоторых недостатков, а к автору имеется ряд замечаний:

1. К техническим недостаткам оформления работы можно отнести отсутствие единого стандарта оформления списка литературы. В одних случаях литературные ссылки даны по названиям статей, а в других по их автору.

2. По тексту диссертации встречаются несогласованные предложения и опечатки. По-видимому, автор диссертационной работы хорошо владеет иностранными языками, поскольку структура отдельных предложений в тексте диссертации более соответствует англоязычному стилю фразопостроения, нежели структуре русского языка.

3. В некоторых предложениях использованы крайне сложные конструкции, в результате которых происходит утрата их смыслового содержания. Так, к примеру, на странице 59 диссертации говорится, цитирую: «...максимальное накопление изучаемых БТШ происходит в определенном температурном диапазоне, превышение и понижение которого не приводит к увеличению содержания данных белков», если воспринимать буквально сказанное, то читатель остается в недоумении: о каком «понижении диапазона» идет речь в этом заключении? Не говоря уже о том, что в случае оценки диапазона температур необходимо обозначать его точные границы (например в диапазоне от 0 до +10°C и т.п.).

4. Также автору можно порекомендовать использовать более точные формулировки, поскольку излишнее обобщение может навредить правильному восприятию текста. К примеру, в выводах диссертационной работы говорится буквально: «умеренное тепловое воздействие приводит к усилению продукции АФК в культуре клеток растений и дрожжей», в то время как при более точных формулировках следует говорить о культуре клеток растений и дрожжей конкретных видов (т.е. озимой пшеницы, сахарного тростника и конкретных штаммов дрожжей), изученных в рамках указанной работы. Вполне допустимо, что на других видах растений и дрожжей, могут быть получены результаты, отличающиеся от представленных.

5. Вызывает удивление практически полное отсутствие в автореферате материалов оценки синтеза БТШ, которые довольно подробно представлены в разделе 1.2 «Синтез БТШ как ответная реакция клеток на изменение температуры» самой диссертации.

Из собственно научных моментов в работе хотелось бы отметить следующие:

1. Так, в работе исследовали изменение содержания БТШ в суспензионных культурах клеток растений. Показано, что уровень БТШ70 в клетках культуры озимой пшеницы повышается в ответ на действие высоких температур. Однако уровень БТШ70 по каким-то причинам не был оценен у культуры клеток сахарного тростника.

2. Исходя из представленных диссертантом материалов, тепловое воздействие в течение 30 мин приводит к повышению содержания АФК в клетках культуры озимой пшеницы и сахарного тростника. Однако повышение потенциала на внутренней мембране митохондрий происходит только в клетках озимой пшеницы и не наблюдается в культуре сахарного тростника. Как можно это объяснить?

