

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 003.047.01 НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ СИБИРСКОГО ИНСТИТУТА ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 17.06.2015, протокол № 3

О присуждении Федяевой Анне Валерьевне, Российская Федерация - ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Продукция активных форм кислорода и митохондриальный мембранный потенциал при температурном воздействии в клетках растений и дрожжей» по специальности 03.01.05 – «физиология и биохимия растений» принята к защите 6 апреля 2015 г., протокол № 2 диссертационным советом Д 003.047.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, 664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317, приказ о создании диссертационного совета №105/нк от 11 апреля 2012 г.

Соискатель Федяева Анна Валерьевна 1988 года рождения. В 2011 году соискатель окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Иркутский государственный университет». Анна Валерьевна работает ведущим инженером в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском институте физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН.

Диссертация выполнена в лаборатории физиологической генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук.

Научный руководитель – Побежимова Тамара Павловна, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, главный научный сотрудник лаборатории физиологической генетики.

Официальные оппоненты:

1. Тимофеев Максим Анатольевич, доктор биологических наук; директор научно-исследовательского института биологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Иркутский государственный университет»; заведующий лабораторией «Проблемы адаптации биосистем» НИИ биологии ФГБОУ ВПО «ИГУ»; профессор кафедры гидробиологии и зоологии беспозвоночных биолого-почвенного факультета ФГБОУ ВПО «ИГУ».

2. Шпаковский Георгий Вячеславович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), заведующий лабораторией механизмов генной экспрессии.

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования «Воронежский государственный университет», г. Воронеж в своем **положительном заключении**, подписанном Поповым Василием Николаевичем, д.б.н., профессором, заведующим кафедрой генетики, цитологии и биоинженерии, указала, что диссертация А.В. Федяевой является законченным исследованием, выполненным на высоком научном уровне с применением современных методов и подходов, 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.

Соискатель имеет **30 опубликованных работ**, в том числе **по теме диссертации 19 работ** объемом 3,18 печатных листов, опубликованных в **рецензируемых научных изданиях – 6 работ.**

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Федяева А.В. Синтез БТШ и гибель культур клеток растений при тепловом воздействии / А.В. Федяева, А.В. Степанов, Т.П. Побежимова, Е.Г. Рихванов // Вестник Иркутского государственного технического университета. – 2014. – № 2. – С. 167–171.

2. Тепловой шок индуцирует продукцию активных форм кислорода и повышает потенциал на внутренней митохондриальной мембране в клетках озимой пшеницы / А.В. Федяева, А.В. Степанов, И.В. Любушкина, Т.П. Побежимова, Е.Г. Рихванов // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 11. – С. 1202–1210.

3. Механизм гибели дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при тепловом шоке. Влияние циклогексимида на этот процесс / Е.Г. Рихванов, И.В. Федосеева, Н.Н. Варакина, Т.М. Русалева, А.В. Федяева // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 1. – С. 22–32.

4. Мутация *petite* подавляет индукцию синтеза белка теплового шока (Hsp 104) *Saccharomyces cerevisiae* в стационарной фазе роста / И.В. Федосеева, Е.Г. Рихванов, Н.Н. Варакина, Т.М. Русалева, Д.В. Пятрикас, А.В. Степанов, А.В. Федяева // Генетика. – 2014. – Т. 50, № 3. – С. 273–281.

5. Winter wheat cells subjected to freezing temperature undergo death process with features of programmed cell death / I.V. Lyubushkina, O.I. Grabelnych, T.P. Pobezhimova, A.V. Stepanov, A.V. Fedyayeva, I.V. Fedoseeva, V.K. Voinikov // Protoplasma. – 2014. – V. 251. – P. 615–623.

6. Активация гибели клеток в суспензионной культуре сахарного тростника под действием повышенных температур / И.В. Любушкина, А.В.

Федяева, Т.П. Побежимова, А.В. Степанов, Е.Г. Рихванов // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2014. – Т. 10, № 4. – С. 13–24.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1) д.б.н., проф., чл.-корр. РАН Б.Ф. Ванюшина, ФГБНУ ВНИИСБ, г. Москва; 2) д.б.н., проф. Ю.Е. Колупаева, ХНАУ им. Докучаева, Украина, г. Харьков; 3) к.б.н. Т.И. Николаевой, ИТЭБ РАН, г. Пушкино; 4) д.б.н. К.А. Петрова, ИБПК СО РАН, г. Якутск; 5) д.б.н. В.В. Талановой и к.б.н. Ю.В. Венжик, ИБ КарНЦ РАН, г. Петрозаводск; 6) д.б.н., доц. О.А. Тимофеевой, ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) Федеральный университет», г. Казань; 7) д.б.н. Т.М. Хлебодаровой, ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск; 8) д.б.н., проф. В.Н. Хрянина, ФГБОУ ВПО «Пензенский государственный университет», г. Пенза; 9) к.б.н. Д.Р. Масленниковой и д.б.н., проф. Ф.М. Шакировой, ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа; 10) д.б.н., проф. Т.К. Головки, ИБ Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар; 11) к.б.н. Д.А. Кнорре, НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ, г. Москва; 12) д.б.н. Ф.В. Минибаевой и к.б.н. В.В. Рябовол, КИББ КазНЦ РАН, г. Казань; 13) д.б.н., проф. Р.А. Волкова, ЧНУ; Украина, г. Черновцы; 14) д.б.н., проф. Д. А. Лося, ИФР РАН, г. Москва.

В качестве замечаний в отзывах указывается.

Замечания в отзыве ведущей организации: 1) Почему протонофоры хорошо защищали клетки дрожжей от гибели только в низких концентрациях, но не в высоких? 2) Встречаются опечатки, повторение слов-синонимов, в списке сокращений и основных обозначений. Наряду с англоязычными аббревиатурами химических соединений приведены и русскоязычные; 3) Способ цитирования литературных источников по тексту выбран неудачно; 4) Название раздела «Изменение интенсивности флуоресценции FDA при действии повышенных температур у суспензионной культуры клеток озимой пшеницы» сформулировано неудачно; 5) Необходимы биохимические и молекулярно-генетические маркеры ПКГ; 6) 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?

Замечания в отзыве официального оппонента д.б.н., М.А. Тимофеева:

1) Отсутствие единого стандарта оформления списка литературы; 2) По тексту диссертации встречаются несогласованные предложения и опечатки; 3) В некоторых предложениях использованы крайне сложные конструкции; 4) автору рекомендуется использовать более точные формулировки, например для оценки границ диапазона температур; 5) Отсутствие в автореферате материалов оценки синтеза БТШ; 6) По каким причинам не был оценен уровень БТШ70 у культуры клеток сахарного тростника? 7) Как можно объяснить, что повышение потенциала на внутренней мембране митохондрий происходит только в клетках озимой пшеницы и не наблюдается в культуре сахарного тростника? 8) Автору необходимо попытаться выяснить причину гиперполяризации мембраны при тепловом воздействии.

Замечания в отзыве официального оппонента д.б.н. Г.В. Шпаковского: 1) Литературный обзор не иллюстрирован; 2) В тексте обзора есть ряд стилистических погрешностей; 3) В тексте диссертации все работы цитируются по первому автору и году публикации, в этом списке 8 из 23 русскоязычных и 65 из 175 англоязычных публикаций приводятся почему-то по названиям статей; 4) Алфавитный порядок размещения ссылок не соблюдается в трёх местах; 5) Как автор объясняет данные, что при температуре 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.

Д.б.н., проф. Т.К. Головки: 1) В автореферате не нашел отражения факт, что АФК являются сигнальными молекулами, в том числе, способствующими формированию адаптивной реакции.

К.б.н. Д.А. Кнорре: 1) Чем объясняется снижение интенсивности сигнала DCF при воздействии на клетки высокой температурой (более 50 градусов)? Не может ли это свидетельствовать об инактивации эстераз, необходимых для активации этого зонда? 3) Нельзя ли интенсивное накопление зондов в клетках дрожжей, подвергнутых тепловому шоку, объяснить инактивацией помп множественной лекарственной устойчивости (МЛУ)?

Д.б.н. Ф.В. Минибаевой и к.б.н. В.В. Рябовол: 1) Обнаруженная автором взаимосвязь между митохондриальным мембранным потенциалом и образованием АФК указывает лишь на потенциальное вовлечение митохондрий в образование АФК; 2) Насколько корректно можно интерпретировать изменения внутриклеточных показателей, таких как мембранный потенциал и содержание АФК, при использовании экстремально высоких температур (55-60°C)? 3) С какой целью была использована линия суспензионной культуры сахарного тростника, устойчивая к аноксии, если автором изучался температурный стресс?

Д.б.н., проф. Д.А. Лося: а) Отсутствие в работе какой-либо гипотезы о возможном уровне регуляции ответов клеток на тепловое воздействие, регуляторных событиях и «точках соприкосновения» кальция и АФК в митохондриях: транскрипционный, трансляционный, посттрансляционный.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их широкой известностью своими достижениями в области физиологии и биохимии растений, митохондриологии, генной экспрессии стрессовых белков и их функционировании. Их высокая квалификация позволяет объективно оценить научную и практическую значимость диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработано положение, вносящее значительный вклад в понимание механизмов редокс-метаболизма митохондрий в клетках растений и дрожжей при стрессовом воздействии;

предложена оригинальная гипотеза механизма митохондриальной продукции АФК при тепловом воздействии и связь данного процесса с гомеостазом внутриклеточного кальция;

доказано, что на раннем этапе теплового воздействия наблюдается повышение продукции АФК и гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны, что указывает на причинно-следственную связь между этими процессами;

Введены понятия: а) мягкое тепловое воздействие, воздействие при котором синтезируются БТШ и наблюдается адаптация; б) умеренное тепловое воздействие, воздействие при котором наблюдается ПКГ, в) жесткое тепловое воздействие, воздействие при котором клетка погибает по типу некроза.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что доказано положение: повышение генерации АФК в клетках растений и дрожжей на ранней стадии теплового воздействия определяется повышением митохондриального мембранного потенциала и зависит от внутриклеточного кальциевого гомеостаза.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс подходов, включающих современные методы исследования и выбор удобных модельных объектов;

изложены результаты, показывающие связь между продукцией АФК и уровнем митохондриального потенциала. В суспензионных 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 повышения митохондриального потенциала и АФК зависят от гомеостаза внутриклеточного кальция;

раскрыты противоречия относительно причин усиления митохондриальной генерации АФК и связью данного процесса с изменением митохондриального мембранного потенциала, а также гибелью клеток при тепловом воздействии;

изучен уровень продукции АФК, митохондриального потенциала, влияние хелатора кальция и блокатора кальциевых каналов на эти процессы в культуре клеток озимой пшеницы. В качестве объектов сравнения использовали культуру клеток сахарного тростника и клетки дрожжей;

проведена модернизация существующих представлений о механизмах митохондриальной генерации АФК в клетках растений и дрожжей.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что

определены концентрации протонофоров и других агентов, которые эффективно подавляют продукцию АФК и защищают клетку от гибели при тепловом воздействии;

создана модель активации экспрессии защитных генов при температурном воздействии;

представлены результаты, которые могут быть использованы в сельском хозяйстве для создания препаратов, снижающих окислительный стресс и, таким образом, повышающих урожайность пшеницы и других сельскохозяйственных культур.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

для экспериментальных работ результаты получены с применением оборудования Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН, с использованием стандартных и апробированных методик. Показана воспроизводимость результатов в различных опытах.

теория построена на существующих в литературе экспериментальных данных, свидетельствующих о вкладе мембранного потенциала митохондрий в продукции АФК изолированных митохондрий клеток животных.

идея базируется на том, что повышение потенциала на внутренней мембране митохондрий при действии теплового шока приводит к перевосстановлению дыхательной цепи, и это является причиной усиления продукции АФК в культуре клеток озимой пшеницы.

Использовано сравнение авторских данных и данных, полученных другими авторами по рассматриваемой тематике;

установлено, что полученные выводы и обнаруженные закономерности не противоречат результатам, представленным в независимых источниках по данной тематике;

использованы современные методики сбора и обработки электронной информации, такие как PubMed, Google Академия, The Arabidopsis Information Resource (TAIR), Saccharomyces Genome Database (SGD) и др.

Личный вклад соискателя состоит в планировании и проведении экспериментов, анализе полученных данных, подготовке и публикации результатов исследования в научных журналах, а также в апробации результатов исследования на конференциях. Экспериментальные данные с использованием клеток растений получены лично автором в соавторстве с И.В. Любушкиной, А.В. Степановым, Т.П. Побежимовой. Эксперименты с использованием клеток дрожжей проведены в соавторстве с Д.В. Пятрикасом, И.В. Федосеевой, Н.Н. Варакиной, Е.Г. Рихвановым.

На заседании 17 июня 2015 г. диссертационный совет принял решение присудить Федяевой А.В. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 14 человек, из них 13 докторов наук, участвовавших в заседании, из 19 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 0 человек, проголосовали: за присуждение ученой степени – 14, против присуждения ученой степени – 0, недействительных бюллетеней – 0.

Председатель диссертационного совета Д 003.047.01,

чл. корр. РАН

Ученый секретарь диссертационного совета Д 003.047.01,

кандидат биологических наук

17 июня 2015

Салаяев Рюрик Константинович

Акимова Галина Петровна