

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА К.Б.Н. О.В. ВОЙЦЕХОВСКОЙ
на диссертационную работу Комаровой Надежды Романовны «ФИЗИОЛОГО-
БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА
ЛАКТАТА В РАСТЕНИЯХ ПРИ НЕДОСТАТКЕ КИСЛОРОДА»
по специальности 1.5.4 – «Биохимия» и 1.5.21 – «Физиология и биохимия растений»,
представленную к защите 12 мая 2022 г. в диссертационном совете Д 24.2.288.02 при
Воронежском государственном университете по адресу: 394036, Воронеж,
Университетская пл., 1.

Реакции превращения лактата представляют собой важнейшую часть анаэробного метаболизма живой клетки, а особую роль эти реакции приобретают в клетках аэробных организмов, подвергающихся временному воздействию недостатка кислорода. Для растений способность переносить гипоксию крайне важна в связи с высокой вероятностью подтопления во время паводков, таяния снега, заболачивания почв и т.п. в естественной среде их обитания. Очевидно, что для сельскохозяйственно ценных культур устойчивость к временной гипоксии может стать критически важным фактором, определяющим дальнейший урожай, и выявление физиологических, биохимических и молекулярных механизмов, помогающих успешно преодолевать данный стресс, имеет большое значение. Поэтому тема диссертационной работы Надежды Романовны Комаровой весьма **актуальна**. Диссертационная работа отличается **существенной теоретической значимостью**, оригинальностью и **новизной**, поскольку большинство данных получено автором впервые, а также оригинальна и новая предложенная автором схема участия двух изученных ею биохимических реакций в адаптации растений к условиям гипоксии. Результаты проведенных исследований могут быть использованы при чтении курсов лекций по физиологии и биохимии растений, биохимии и общей биологии; кроме того, получение очищенного препарата и биохимическая характеристика малоизученного растительного фермента L-лактат: цитохром *c* – оксидоредуктазоподобной гликолатоксидазы (ЛЦО-подобной гликолатоксидазы) из двух видов сельскохозяйственно важных культур – гороха и сорго, а также из микроводорослей, имеет потенциал для биотехнологических разработок. В этом состоит **практическая значимость** работы.

Диссертация состоит из Введения и двух глав – «Обзор литературы» и «Экспериментальная часть». Вторая глава включает разделы и «Объекты и методы исследования» и «Результаты и их обсуждение». Кроме того, диссертация содержит Заключение, Выводы и Список литературы, который включает 234 источника. Диссертация изложена на 137 страницах, включая 51 рисунок и 6 таблиц; диссертация также имеет Приложение, в котором содержится 19 рисунков и 7 таблиц. Диссертацию предваряет список сокращений, использованных автором. Во Введении автором обсуждается критическое значение биосинтеза и метаболизма лактата у аэробных организмов для выживания в кратковременных условиях недостатка кислорода, и подчеркивается особая роль двух реакций: восстановления пирувата лактатдегидрогеназой и окисления лактата малоизученным специфичным для растений

ферментом ЛЦО-подобной гликолатоксидазой. Во Введении автор формулирует **цель** диссертационной работы как изучение биохимических и молекулярных механизмов регуляции метаболизма лактата у растений с контрастной устойчивостью к гипоксии. Во Введении также перечислены **задачи** (всего **восемь задач**), которые логично вытекают из поставленной диссертантом цели исследования.

Обзор литературы включает 40 страниц, он хорошо структурирован и разбит на шесть разделов. В первом разделе автор рассматривает центральную роль лактата в метаболизме аэробной клетки в условиях недостатка кислорода. Второй раздел посвящен анализу современных знаний о метаболических путях адаптации растительных клеток к гипоксии. В третьем разделе рассмотрены особенности спиртового и молочнокислого брожения в клетках растений и суммированы представления о лактатдегидрогеназах растений, их изоформах и механизме катализируемых реакций. Четвёртый раздел посвящен характеристике лактатоксидазы (L-лактат: цитохром с – оксидоредуктазы) и анализу физиологической роли этого фермента у аэробных микроорганизмов и некоторых водорослей. В пятом разделе автор подчеркивает тесную сопряженность реакций метаболизма 2-фосфогликолата и лактата, и рассматривает современные представления об эволюции лактатоксидазы, а также специфичные особенности фермента ЛЦО-подобной гликолатоксидазы у растений. Подчеркивается структурное сходство этого фермента с флавоцитохромом b₂, а также суммируются представления о каталитическом механизме и о физиологической роли этого фермента в растениях при различных стрессовых воздействиях. Наконец, в шестом разделе автор анализирует имеющиеся данные о регуляции экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма лактата микроорганизмов и растений, а также растительных гликолатоксидаз.

Обзор литературы полностью соответствует поставленной цели и задачам и показывает хороший научный кругозор автора, который со скрупулезной тщательностью собрал практически весь имеющийся в литературе материал о ЛЦО-подобной гликолатоксидазе растений. В некоторых местах автор использует довольно сложные фразы, что, возможно, связано с не всегда удачным переводом англоязычной литературы. В целом обзор оставляет очень хорошее и основательное впечатление. Его следовало бы заключить небольшим резюме, из которого еще раз можно было бы увидеть необходимость и важность тех экспериментальных работ, которые проведены автором в рамках данного диссертационного исследования, в контексте проанализированного автором материала.

Глава «Экспериментальная часть» состоит из двух разделов. Раздел «Объекты и методы исследования» даёт описание растительных объектов, а также спектра методов, использованных для решения поставленных задач. Все выбранные методы адекватны поставленным задачам. Однако, к описанию как объектов исследования, так и самих методов, имеются замечания.

Во-первых, автор нигде не объясняет выбор гороха и сорго для проведения экспериментов. Уже по ходу чтения работы становится понятным, что сорго является устойчивым, а горох – чувствительным к корневой гипоксии видом. Однако, этот

важный факт, который видимо и повлиял на выбор объектов, специально не освещается ни в литературном обзоре, ни в разделе «Объекты исследования». Между тем эта информация важна для интерпретации получаемых автором данных. Автор не уточняет, сколько дней было использовавшимся в опытах проросткам, на какой стадии развития они находились, и на какой среде и в каких световых условиях они выращивались? Не указано также, какими были спектральный состав и интенсивность света, при котором культивировали микроводоросли. Какие витамины вносили в состав среды для микроводорослей? Наконец, латинское название вида приведено для водоросли, но не для гороха и сорго. Было бы целесообразно указать полное латинское название всех изучаемых видов в разделе, где описываются объекты, а также в целях и задачах работы.

Другим недочетом является отсутствие подробных протоколов для выделения и очистки ферментов, а также молекулярных исследований, с помощью которых стало возможным получение основных результатов данной работы. Проводился ли контроль чистоты РНК от загрязнения геномной ДНК перед синтезом кДНК на основе РНК - например, ПЦР с праймерами к убиквитину с использованием выделенного препарата РНК в качестве матрицы? При описании метода ПЦР в реальном времени, использованного для количественной оценки уровней экспрессии генов, автор практически опускает детали. Некоторая информация присутствует в разделе «Результаты и обсуждение», например, о методе расчета уровней экспрессии, но место этой информации - в методическом разделе. Автор нигде не указала, учитывалась ли при расчетах эффективность использованных для каждого гена праймеров. Однако, учет эффективности может изменить оценку уровня экспрессии, т.е. кажущаяся разница в уровнях экспрессии изучаемых генов может исчезнуть при введении учета эффективности прайминга. Эта информация не всегда приводится в научных статьях, но она обязательно должна указываться в методической части диссертационной работы. Также в работе следовало бы привести хотя бы краткий протокол окраски гелей тетразолиевым синим, а не ограничиваться ссылкой на опубликованную статью.

Автор указала, что проводилась статистическая обработка результатов, но нигде на рисунках и в таблицах не указано, в каких случаях различия статистически достоверны, а в каких – нет; также не сказано, что именно отражает показанный на графиках разброс – ошибку среднего? стандартное отклонение выборки? Хотелось бы пожелать автору обратить серьезное внимание на то, что даже самые очевидные «на глаз» различия не являются доказанными, если не были применены адекватные статистические методы оценки значимости этих различий, результаты которой следует отразить на рисунках и в таблицах.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из 12 подглав. Результаты, полученные диссертантом, полностью соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Большинство из них получено впервые.

Подглавы 2.2.1 и 2.2.2 дают описание изменений активности лактатдегидрогеназы и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы в листьях и корнях гороха при гипоксии и во время восстановления после гипоксии, а также для сравнения

приводится динамика активности одного из ключевых ферментов цикла Кребса, сукцинатдегидрогеназы, в тех же условиях. На основании полученных данных автор смогла перейти к следующей, очень важной части работы – получению очищенных препаратов и биохимической характеристике изучаемых ферментов. В подглаве 2.2.3 эти работы подробно описаны для лактатдегидрогеназы гороха. Определены значения констант Михаелиса для субстратов, молекулярная масса отдельных субъединиц, исследован субъединичный состав и изучено влияние на активность лактатдегидрогеназы температуры и pH на скорость катализируемой реакции. Все результаты получены автором впервые. Относительно молекулярной массы хотелось бы уточнить, что речь, вероятно, идет о кажущейся молекулярной массе, поскольку ее значения получены автором на основании электрофоретической подвижности, но не расчетным методом на основе аминокислотной последовательности белка фермента. В подглаве 2.2.4 изучена динамика экспрессии гена, кодирующего лактатдегидрогеназу гороха, в ответ на гипоксию, и убедительно показано, что активность фермента контролируется на уровне транскрипционной активности соответствующего гена. В этой же подглаве приводится методика клонирования фрагментов кДНК лактатдегидрогеназы (страницы 74-78), которую следовало бы поместить в описание методов. Недостатком является и отсутствие обсуждения вопроса, кодируется ли лактатдегидрогеназа гороха единичным геном или генным семейством, и насколько клонированный фрагмент соответствует именно тому гену, экспрессия которого в наибольшей степени отвечает за наблюдаемое увеличение активности фермента в условиях гипоксии проростков гороха. Следует отметить, что геном *Pisum sativum* к настоящему времени секвенирован и аннотирован (Kreplak et al., Nature Genetics, 2019, 51:1411-1422), и автор вполне мог бы провести данный анализ.

Вторая часть раздела (подглавы 2.2.5 – 2.2.6) посвящена исследованиям ЛЦО-подобной гликолатоксидазы гороха. Большую ценность представляет собой успешное решение диссертантом задачи очистки и получения гомогенного препарата данного малоизученного белка, включая разработанный ею протокол. Несмотря на то, что ключевые детали и этапы изложены в тексте работы и в приложении, полный протокол, включающий все стадии, в том числе рутинные, несомненно заслуживал бы подробного изложения в рамках диссертации. Получение очищенного препарата позволило автору определить основные биохимические характеристики ЛЦО-подобной гликолатоксидазы: субъединичный состав, молекулярную массу и зависимость скорости катализируемой реакции от температуры и pH, а также сродство к субстратам и кофакторам. Подтверждена транскрипционная регуляция активности ЛЦО-подобной гликолатоксидазы в ответ на гипоксию и последующий возврат к нормоксии.

Третья часть разделы (подглавы 2.2.7 – 2.2.8) посвящены исследованиям лактатдегидрогеназы и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы у сорго. После определения динамики активности ферментов в экстрактах листьев и корней сорго, автором был успешно применен разработанный ранее протокол экстракции и очистки, и для гомогенных препаратов определены молекулярная масса, субъединичное строение и основные биохимические характеристики. Полученные данные обладают большой ценностью, поскольку подобные сведения в литературе имеются лишь для двух видов

растений. Автором также была исследована регуляция соответствующего гена, и показано соответствие динамики изменений активности фермента и уровня транскриптов ЛЦО-подобной гликолатоксидазы в ответ на гипоксию и последующий возврат к нормоксии. Здесь также следовало бы провести работу с доступными последовательностями аннотированного генома сорго (Paterson et al., Nature, 2009, 457:551-556), чтобы выяснить, кодируется ли изучаемый фермент единственным геном или генным семейством, и динамика транскриптов какого именно гена исследована.

Последние подглавы раздела (2.2.9 – 2.2.12) описывают очистку и биохимическую характеристику лактатдегидрогеназы и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris*. С этой задачей автор также успешно справилась. Таким образом, в распоряжении автора оказались биохимические характеристики двух ферментов метаболизма лактата, индуцируемых в ходе стрессового воздействия недостатком кислорода, которые в совокупности с анализом имеющихся литературных данных позволили ей высказать в Заключение крайне интересную гипотезу об возможных путях эволюционной трансформации реакций метаболизма лактата у аэробных организмов и ее связи с формированием комплекса реакций фотодыхания у растений. Также автор приводит схему, которая иллюстрирует роль изученных ферментов в ответе растений на временную гипоксию (рис. 72). Безусловно, с автором можно согласиться; хотелось бы также увидеть обсуждение обнаруженных различий между листьями и корнями, а также между устойчивым и неустойчивым к гипоксии видами. Возможно, автору не хватило объема раздела «Заключение»; деление раздела 2 на «Результаты» и «Обсуждение» позволило бы автору лучше сконцентрироваться на обсуждении биологической, эволюционной и практической значимости полученных результатов в соответствующем разделе.

Диссертация хорошо оформлена и грамотно написана. Несколько неудачным представляется решение автора нумеровать таблицы и рисунки как основного текста, и так приложения, по мере их упоминания в тексте: таким образом, в тексте работы нумерация таблиц начинается с 3, а таблицы 1 и 2 находятся в приложении.

Однако, приведенные в отзыве замечания касаются преимущественно представления материала, но никак не полученного автором обширнейшего материала высокого научного уровня. Сделанные в работе выводы полностью обоснованы. Замечания не умаляют научной значимости диссертационной работы и не снижают произведённого общего впечатления от выполненного исследования. Хочу ещё раз отметить высокий методический и теоретический уровень выполнения работы и безусловную научную ценность полученных автором результатов.

Автореферат диссертации Н.Р. Комаровой полностью отражает содержание самой диссертации. Материалы диссертационной работы неоднократно докладывались на Всероссийских и международных конференциях. По теме диссертации автором опубликовано четыре научные статьи в журналах, рекомендованных ВАК, которые вполне отражают результаты, полученные автором в ходе ее работы над диссертацией.

Оценивая работу в целом, можно заключить, что по объёму проведённых исследований, по научной значимости полученных результатов, по разнообразию и

адекватности применённых методов исследования, диссертационная работа Комаровой Н.Р. представляет собой завершённое, важное и интересное исследование. Написанная диссертация полностью соответствует требованиям "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, а её автор - требованиям, предъявляемым к работам, представляемым к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.4 - «Биохимия растений» и 1.5.21 – «Физиология и биохимия растений». Комарова Н.Р. заслуживает присуждения этой степени.

15 апреля 2022 г.

Ольга Владимировна Войцеховская
Кандидат биологических наук,
зав. лабораторией экологической физиологии
ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова
Российской академии наук
197376 Санкт-Петербург,
ул. Профессора Попова, 2
(812) 372-54-00
ovoitse@binran.ru

/О.В.Войцеховская/

Подпись руки *Войцеховской О.В.*
ЗАВЕРЯЮ *и.о. нач. о/к*
ОТДЕЛ КАДРОВ
Ботанического института
им. В.Л. Комарова
Российской академии наук



Подпись заверю
Директор БИИ РАН
Д.Р. Тельманов
15.04.2022