



«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор ИИГУ по научной работе,

д.ф.-м.н.

М.В. Иванченко

« 25 » апреля 2022 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» на диссертационную работу Комаровой Надежды Романовны «Физиолого-биохимические механизмы регуляции ферментов метаболизма лактата в растениях при недостатке кислорода», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 1.5.4 – Биохимия и 1.5.21 – Физиология и биохимия растений

Актуальность темы выполненной работы

Исследование возможных адаптивных реакций, обеспечивающих приспособление организмов к меняющимся условиям среды является одним из ключевых направлений развития физико-химической биологии. Одни из частых неблагоприятных факторов, влияющих на метаболизм и в конечном счете на продуктивность растений, является почвенная гипоксия корней и прикорневой части побегов, возникающая в результате затопления. Реакция растений на гипоксию связана с обменом важных органических кислот, в частности с изменением метаболизма пировиноградной кислоты, ключевого звена энергетического углеводного обмена у всех организмов. При недостатке кислорода в клетках запускаются процессы молочно-кислого и спиртового брожения, что может приводить к нарушению метаболизма растений. Следует отметить, что у растений с С3- и С4-типом фотосинтеза эти процессы могут различаться. Многие из этих растений являются важными сельскохозяйственными культурами, что доказывает значимость проводимых исследований для продовольственной безопасности в мире. Поэтому выявление механизмов регуляции активности ферментативных систем, участвующих в обмене пировиноградной и молочной кислот, имеет несомненно важное фундаментальное и практическое значение для биохимии и физиологии растений. Поэтому цель представленной диссертационной работы – изучение биохимических и молекулярных механизмов регуляции энзимов, метаболизирующих лактат и пируват в растениях с разным типом обмена веществ при гипоксии является своевременной и актуальной.

Структура и объем работы

Структура представленной диссертационной работы стандартна и состоит из введения, обзора литературы (глава I), экспериментальной части и обсуждения результатов (глава II), заключения, выводов и списка литературы (234 источника). Иллюстрационный материал представлен в виде 13 таблиц и 72 рисунка. В приложении содержится 7 таблиц и 19 рисунков. Работа изложена на 155 страницах, включая приложение.

Во введении автор обосновывает актуальность темы исследования, формирует цели и задачи исследования.

В обзоре литературы приведен анализ современных литературных данных, освещающий вопросы, касающиеся роли возможных адаптивных реакций, обеспечивающих приспособление организмов при недостатке кислорода. Подробно описаны этапы эволюции ферментов семейства оксидаз гидроксикислот, а также метаболические механизмы адаптации растений к гипоксии. Описано строение, распространенность в живых организмах таких ферментов как лактатдегидрогеназа (ЛДГ), алкогольдегидрогеназа, L-лактат:цитохром с-оксидоредуктаза. Обсуждаются эволюционные пути возникновения фотодыхания, биогенез ферментов семейства гликолатоксидаз. Сделано предположение, что гликолатоксидазы могут участвовать в метаболизме лактата. Давая оценку проведенному анализу литературных источников, можно сказать, что диссертант, отчетливо представляет состояние рассматриваемой проблемы.

Глава 2 «Экспериментальная часть» включает два раздела: «*Объекты и методы исследований*» и «*Полученные результаты и их обсуждение*».

Раздел «*Объекты и методы исследований*» изложен достаточно подробно. Следует отметить большой набор современных биохимических и молекулярных методов, используемых в работе и хороший научно-методический уровень проведенных исследований. Экспериментальная часть работы выполнена на высоком научно-методическом уровне. Биохимические методики, использованные в работе, описаны достаточно подробно и могут быть легко воспроизведены. Работа выполнена на трех различных растительных объектах, а именно горохе, сорго и водоросли *Chlorella vulgaris*.

Раздел «*Полученные результаты и их обсуждение*» кандидатской диссертации включает 12 подразделов.

В подразделе «Динамика активности ЛДГ и ЛЦО-подобной ГО в листьях и корнях гороха в условиях гипоксии» в корнях и листьях гороха проведен анализ динамики активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) при действии гипоксии (72 часа), вызванной затоплением и L-лактат:цитохром с-оксидоредуктаза подобной гликолатоксидазы (ЛЦО-подобной ГО) при последующем возвращении к нормальной аэрации (96 часов).

В подразделе «Динамика активности СДГ в корнях и листьях гороха,

экспонируемых в условиях гипоксии» автор убедительно доказывает, что гипоксия вызывает изменение энергетического метаболизма. Снижение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в листьях через час после затопления и в корнях через 6 часов свидетельствует о выключении цикла трикарбоновых кислот клеток гороха.

В подразделе «Получение гомогенных препаратов исследуемых энзимов из листьев и корней гороха» автор приводит подробное описание результатов очистки ЛДГ на ДЭАЭ-сефацелле, оценке электрофоретической гомогенности полученного препарата фермента, определение молекулярной массы и субъединичного строения, определение значений K_m по пирувату, НАД⁺ и НАДН, а также лактату, определение константы субстратного ингибирования, влияния температуры и рН на скорость реакции. Полученные результаты полностью характеризуют ЛДГ корней и листьев гороха и позволяют сравнить ее с ЛДГ других организмов.

В подразделе «Молекулярные исследования ЛДГ гороха» проведено исследование экспрессии гена этого фермента в листьях и корнях при гипоксии. Для этого с помощью базы данных KEGG выровнены последовательности ЛДГ из семейства бобовые и подобраны вырожденные праймеры. С помощью этих праймеров был секвенирован участок гена ЛДГ и проанализирована его экспрессия. Автором продемонстрирована активация экспрессии гена ЛДГ при гипоксии в листьях через два часа, а в корнях через 12.

В подразделе «Экстракция и очистка ЛЦО-подобной гликолатоксидазы» автор приводит подробное описание результатов очистки и биохимического анализа ЛЦО-подобной ГО гороха, по алгоритму, использованному для ЛДГ. Охарактеризована структура 4-субъединичного фермента с молекулярной массой субъединиц 45 кДа, выявлены значения K_m , составляющие для лактата 0,24 (листья) и 0,36 (корни) мМ. Показано, что оптимальное значение рН для фермента в корнях составляет 6,8, в листьях – 7,2.

В подразделе «Молекулярные исследования ЛЦО-подобной гликолатоксидазы гороха» с помощью подобранных автором вырожденных праймеров проанализирована экспрессия гена ЛЦО-подобной ГО в листьях и корнях после возобновления аэрации. Показано, что активность гена возрастает через 6 часов в листьях и через 3 часа в корнях.

В подразделах «Динамика активности ЛДГ и ЛЦО-подобной ГО из сорго, выдержанного в условиях гипоксии методом затопления и при выходе и нее», а также «Экстракция и очистка ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев сорго» представлены результаты экспериментов с сорго, построенных по алгоритму, использованному для гороха. Показано, что у С4-растения сорго гипоксия вызывает более плавное и не столь значительное увеличение активности ЛДГ в корнях и листьях, по сравнению с С3-растением горохом. С другой стороны активность ЛЦО-подобной ГО при восстановлении аэрации возрастает значительно и остается высокой в течение 3 суток эксперимента. Автором

показано, что листья сорго содержат сходный с горохом белок с ЛЦО-подобной ГО активностью, тетрамер, с массой субъединиц 42 кДа. Км ЛЦО-подобной ГО листьев сорго для лактата составляет 0,14 мМ, что свидетельствует о большем сродстве фермента из сорго к этой кислоте, по сравнению с таковым гороха. Экспрессия гена ЛЦО-подобной ГО сорго при возобновлении аэрации максимально активировалась через 12 часов в 58 раз.

В последних трех подразделах автором представлены экспериментальные данные об активности при гипоксии, характеристике ферментов ЛДГ и ЛЦО-подобной ГО из микроводоросли *Chlorella vulgaris*. Указывается, что активность ферментов также возрастает в условиях микроаэрации (ЛДГ) и возвращению к нормальной аэрации. Но к сожалению данные результаты отсутствуют в тексте диссертации. В работе для очищенного ЛДГ показано высокое сродство к НАДН – Км 0,02 мМ, выявлен щелочной уровень рН =8,1. Путем выявления ингибирующего влияния АТФ на активность ЛДГ показано, что очищенный фермент относится к гомотетрамеру ЛДГ-5. Для ЛЦО-подобной ГО хлореллы показана влияние предгипоксии на активацию, оценена молекулярная масса субъединицы гомотетрамера (42,66 кДа), определена Км для лактата 3мМ, рН-оптимум – при 6,8.

В *заключении* диссертационной работы автор подводит итог исследования, строит гипотетическую схему регуляции исследуемых ферментов в листьях гороха и сорго при переходе от гипоксии и нормоксии.

Вводы, которые сформулированы автором, достоверны и логично следуют из полученных ею результатов, соответствуют поставленной цели и задачам.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые для растений гороха и сорго получены гомогенные препараты лактатдегидрогеназы и ЛЦО-подобной ГО. Для обоих ферментов изучены кинетические и физико-химические характеристики. Показана различная скорость и сила активации ферментов и экспрессии из генов в горохе и сорго при гипоксии и возвращению к нормоксии. Полученные в настоящей работе данные обладают безусловной научной значимостью, расширяют и углубляют современные представления о роли ферментов метаболизма лактата в выживании растений в условиях кислородного голодания.

Результаты данной научной работы могут быть внедрены в образовательный процесс в рамках спецкурсов по частной физиологии и биохимии растений, могут быть использованы в дальнейших научных исследованиях.

Вместе с тем анализ работы позволяет сделать некоторые замечания и задать вопросы:

1. В обзоре литературы не описаны критерии, по которым можно характеризовать уровень кислорода как гипоксию. Каким уровнем кислорода характеризуются условия «микроаэрации» при культивировании

- хлореллы? Что известно о том, какое понижение содержания кислорода в воздухе, воде или почве приводит к изменению активности ЛДГ и углеводного энергетического метаболизма в целом?
2. К сожалению, приведенный список сокращений далеко не полный, например, какой фермент, обсуждаемый в обзоре литературы имеется ввиду под аббревиатурой ПДК?
 3. В описании объектов исследования не указано каков был возраст проростков гороха и сорго? В листьях какого яруса для гороха проводили исследования активности ферментов?
 4. Можно ли считать гидропонный метод культивирования растений условиями хронической гипоксии корней?
 5. В работе приводятся результаты по активности сукцинатдегидрогеназы для подтверждения торможения аэробного дыхания митохондрий. При этом в разделе «*Объекты и методы исследований*» не приводится описание методики выделения митохондрий.
 6. В работе тщательно проанализированы характеристики ферментов. Выявлена различная степень сродства ЛДГ корней и листьев гороха к лактату. Чем может быть обусловлена такая закономерность?
 7. Безусловным достоинством работы являются результаты по подбору вырожденных праймеров и анализу экспрессии генов ЛДГ и ЛЦО-подобной ГО. Однако, на наш взгляд, в разделе «*Объекты и методы исследований*» недостаточно полно описаны методики, касающиеся получения этих результатов.
 8. Какие механизмы, сигнальные пути, по мнению автора, задействованы в регуляции активности исследуемых ферментов и экспрессии их генов при гипоксии и возвращению к нормоксии?

Указанные выше замечания, тем не менее, не умаляют достоинств рецензируемой работы. Результаты исследований прошли апробацию на международных и Российских конференциях, достаточно полно отражены в рецензируемых научных изданиях (4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ).

Анализ представленного диссертантом материала свидетельствует об обоснованности и достоверности полученных автором результатов. Выводы аргументированы и в целом объективно отражают полученные экспериментальные данные. Текст автореферата отражает основные результаты и выводы диссертационной работы.

Заключение

На основании всего вышеизложенного можно сделать заключение, что диссертация Комаровой Надежды Романовны на тему «Физиолого-

биохимические механизмы регуляции ферментов метаболизма лактата в растениях при недостатке кислорода» является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи по исследованию биохимических и молекулярных механизмов регуляции энзимов, метаболизирующих лактат и пируват в растениях с разным типом обмена веществ при гипоксии.

Диссертационная работа Комаровой Надежды Романовны «Физиолого-биохимические механизмы регуляции ферментов метаболизма лактата в растениях при недостатке кислорода» является законченным и самостоятельным исследованием и полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Комарова Надежда Романовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по двум специальностям: 1.5.4 – Биохимия и 1.5.21 – Физиология и биохимия растений.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании кафедры биохимии и биотехнологии Института биологии и биомедицины Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского (ННГУ), протокол № 12 от «22» апреля 2022г.

Отзыв составлен
заведующим кафедрой биохимии и
биотехнологии ИББМ ННГУ, кандидат
биологических наук (03.01.05 –
физиология и биохимия растений),
доцент (03.01.04 Биохимия)

Брилкина Анна Александровна

Полное наименование: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Сокращенное наименование Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского (ННГУ)

Почтовый адрес: 603022, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

Официальный сайт организации: <http://www.ibbm.unn.ru/>

Адрес электронной почты: ibbm@unn.ru

Телефон: 8(831) 462-32-02; факс (831) 462-32-02



Брилкина А.А.
Ученый секретарь ННГУ
Л.Ю. Черноморская
Тел. 462-30-21