

Протокол № 111

заседания диссертационного совета 24.2.288.02 по защите
кандидатской диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

от 12.05.2022 г.

Состав диссертационного совета утвержден в количестве 22 человек.

Присутствовало на заседании 16 человек, в т.ч. по специальности 1.5.4 – 8 докторов наук и по специальности 1.5.21 – 3 доктора наук.

Председатель: д.б.н., профессор Артюхов Валерий Григорьевич

Присутствовали: д.б.н., профессор Артюхов Валерий Григорьевич, д.б.н., доцент Вашанов Геннадий Афанасьевич, д.б.н., профессор Грабович Маргарита Юрьевна, д.б.н., профессор Епринцев Александр Трофимович, д.б.н., профессор Ершова Антонина Николаевна, д.б.н., профессор Калаев Владислав Николаевич, д.б.н., профессор Корнеева Ольга Сергеевна, д.б.н., профессор Наквасина Марина Александровна, д.б.н., профессор Попов Василий Николаевич, д.б.н., профессор Попова Татьяна Николаевна, д.б.н., профессор Путинцева Ольга Васильевна, д.фарм.н., профессор Сливкин Алексей Иванович, д.б.н., профессор Холявка Марина Геннадьевна, д.б.н. Казнина Наталья Мстиславовна, д.б.н., доцент Голденкова-Павлова Ирина Васильевна, д.б.н. Носов Александр Владимирович.

Официальные оппоненты:

- Креславский Владимир Данилович, доктор биологических наук, профессор, ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии РАН, группа экологии и физиологии фототрофных организмов, ведущий научный сотрудник – отсутствовал;

- Войцеховская Ольга Владимировна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, зав. лабораторией экологической физиологии – присутствовала.

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (ННГУ)

Слушали: защиту диссертационной работы Комаровой Надежды Романовны на тему: «Физиолого-биохимические механизмы регуляции ферментов метаболизма лактата в растениях при недостатке кислорода», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по двум специальностям 1.5.4 – биохимия и 1.5.21 – физиология и биохимия растений.

Вопросы по защищаемой диссертации задали: д.б.н. Казнина Наталья Мстиславовна, д.б.н., доцент Голденкова-Павлова Ирина Васильевна, д.б.н. Носов Александр Владимирович, д.б.н., профессор Попов Василий Николаевич, д.б.н., профессор Ершова Антонина Николаевна, д.б.н., профессор Артюхов Валерий Григорьевич

В дискуссии приняли участие: д.б.н. Казнина Наталья Мстиславовна, д.б.н., доцент Голденкова-Павлова Ирина Васильевна, д.б.н. Носов Александр Владимирович, д.б.н., профессор Ершова Антонина Николаевна, д.б.н., профессор Артюхов Валерий Григорьевич

Постановили: на основании протокола №1 счетной комиссии считать, что диссертация Комаровой Надежды Романовны отвечает всем требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по двум специальностям 1.5.4 – биохимия и 1.5.21 – физиология и биохимия растений.

Председатель

диссертационного совета

Ученый секретарь

диссертационного совета




Артюхов В.Г.


Грабович М.Ю.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.2.288.02, СОЗДАННОГО
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ» ПО ДИССЕРТАЦИИ
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 12 мая 2022 г. №111

О присуждении Комаровой Надежде Романовне, гражданину РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Физиолого-биохимические механизмы регуляции ферментов метаболизма лактата в растениях при недостатке кислорода» по двум специальностям 1.5.4 – биохимия и 1.5.21 – физиология и биохимия растений, принята к защите 07.03.2022 г. (протокол заседания № 108) диссертационным советом 24.2.288.02, созданным на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет», Министерство науки и высшего образования РФ, 394018, г. Воронеж, Университетская площадь, 1; приказ №717/нк от 09.11.2012.

Решением диссертационного совета 24.2.288.02 (протокол заседания № 108а) от 07.03.2022, для проведения разовой защиты по двум специальностям дополнительно введены: Голденкова-Павлова Ирина Васильевна, доктор биологических наук, доцент (диссертационный совет по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.138.01, созданный на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по специальности 1.5.21. – Физиология и биохимия растений), Казнина Наталья Мстиславовна, доктор биологических наук, (диссертационный совет по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.002.02, созданный на базе Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук по специальностям 1.5.21. – Физиология и биохимия растений, 1.5.15. – Экология), Носов Александр Владимирович, доктор биологических наук, (диссертационный совет по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.138.01, созданный на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева

Российской академии наук по специальности 1.5.21. – Физиология и биохимия растений).

Соискатель Комарова Надежда Романовна, 1 февраля 1989 года рождения, работает биологом городской цитологической лаборатории Муниципального бюджетного учреждения здравоохранения городского округа город Воронеж "Городская клиническая больница скорой медицинской помощи № 10" Министерства здравоохранения РФ.

В 2012 г. окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Воронежский государственный университет».

В 2019 г. окончила очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет».

Диссертация выполнена на кафедре биохимии и физиологии клетки медико-биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет» Минобрнауки России.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор Епринцев Александр Трофимович, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», медико-биологический факультет, кафедра биохимии и физиологии клетки, заведующий.

Официальные оппоненты:

- Креславский Владимир Данилович, доктор биологических наук, профессор, ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии РАН, группа экологии и физиологии фототрофных организмов, ведущий научный сотрудник;

- Войцеховская Ольга Владимировна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, заведующий лабораторией экологической физиологии.

- дали положительные отзывы на диссертацию:

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное учреждение

высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (ННГУ), г. Нижний Новгород, в своем положительном отзыве, подписанным Брилкиной Анной Александровной, кандидатом биологических наук, доцентом, заведующим кафедрой биохимии и биотехнологии ИББМ ННГУ, указала, что в работе 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 Н.Р. полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 30.07.2014 №723, от 21.04.2016 №335, от 02.08.2016 №748, от 29.05.2017 №650, от 28.08.2017 №1024), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор достойна присуждения искомой степени по двум специальностям 1.5.4 – биохимия и 1.5.21 – физиология растений.

Соискатель имеет 14 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 12 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 4 работы.

Все работы посвящены физиолого-биохимическим механизмам регуляции ферментов метаболизма лактата в растениях при недостатке кислорода.

В диссертации Комаровой Надежды Романовны отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. Авторский вклад составляет 85%, объемом 2,0 п.л.

Наиболее значительные работы:

1. А.Т. Епринцев. Физико-химические и регуляторные свойства лактатдегидрогеназы из листьев гороха (*Pisum sativum* L.) в условиях дефицита кислорода / А.Т. Епринцев, Н.Р. Комарова, М.И. Фалалеева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. Т. 55. № 2. – С. 159-164.
2. А.Т. Епринцев. Выделение и очистка лактатдегидрогеназы из корней гороха (*Pisum sativum* L.) при гипоксии и исследование ее регуляторных свойств / А.Т. Епринцев, Н.Р. Комарова, М.И. Фалалеева, А.А. Белоглазова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. Т.55. №5. – С. 544-548.

3. А.Т. Епринцев. Применение ионообменной хроматографии для очистки гликолатоксидазы из листьев гороха (*Pisum sativum* L.) и сорго (*Sorghum sudanense* J.), исследование ее физико-химических и регуляторных свойств / А.Т. Епринцев, Н.Р. Комарова, М.И. Фалалеева, Е.В. Ковалёва, А.В. Миткевич // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2019. Т.19. №1. – С.916-923.

На диссертацию и автореферат получено 8 положительных отзывов от:

1) Петюренко Марты Юрьевны, к.с.-х.н., научного сотрудника отд. лесной генетики и биотехнологии ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии»; 2) Машкиной Ольги Сергеевны, к.б.н., заведующей лабораторией биотехнологией ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии» (ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех., г. Воронеж); 3) Думачевой Елены Владимировны, д.б.н., профессора каф. биологии, доцента Института фармации, химии и биологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»; 4) Дерябиной Юлии Ивановны, к.б.н., старшего научного сотрудника, руководителя лаборатории экологической и эволюционной биохимии Института биохимии им. А.Н. Баха «ФИЦ Биотехнологии РАН»; 5) Машенко Зинаиды Евгеньевны, к.фарм.н., доцента кафедры «Технология пищевых производств и биотехнология» ФГБОУ ВО «Самарский государственный технический университет»; 6) Леонтьевского Алексея Аркадьевича, д.б.н., заведующего лабораторией микробной энзимологии Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН); 7) Наконечной Ольги Валериевны, к.б.н., и.о. зав.сектора микрклонального размножения лесных, сельскохозяйственных и декоративных культур Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии" ДВО РАН; 8) Федуловой Татьяны Петровны, д.б.н., заведующей лабораторией биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара им.А.Л. Мазлумова».

Все отзывы положительные, в них отмечается актуальность работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов. Замечания носят рекомендательный характер.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их компетентностью по тематике диссертационного исследования, наличием публикаций по данной тематике в рецензируемых научных изданиях, включенных в перечень ВАК РФ, содержанием диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

модифицирован метод многостадийной очистки ферментативных препаратов лактатдегидрогеназы и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев и корней гороха, а также из сорго.

предложена гипотетическая модель роли ЛДГ и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы в адаптивной реакции клеточного метаболизма исследуемых растений гороха и сорго к гипоксии и при переходе к нормоксии.

доказано, что в условиях дефицита кислорода происходит увеличение экспрессии гена *ldh*, что более характерно для растений с C_3 -типом фотосинтеза, на примере гороха, по сравнению с C_4 -растениями, на примере сорго.

введены представления о последовательной модификации фермента ЛЦО-подобной гликолатоксидазы у растений за счет эволюции генных локусов *lox* и индукции соответствующих ферментов, *детерминированных* необходимостью адаптации организмов к меняющимся условиям среды, в частности, к увеличению концентрации атмосферного кислорода, вызванного возникновением кислородного фотосинтеза, что, в конечном итоге, способствовало формированию новых метаболических путей ферментов оксидаз.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения диссертационной работы: выявлено, что при дефиците кислорода повышается активность фермента лактатдегидрогеназы в корнях и листьях гороха с целью интенсификации гликолиза, являющегося единственным процессом получения клеткой энергии при гипоксии. При этом в условиях возврата к нормоксии активируется ЛЦО-подобная гликолатоксидаза, которая способна быстро утилизировать накопившиеся порции лактата.

Применительно к проблематике диссертации результативно (эффективно, то есть с получением обладающих новизной результатов)

использованы биохимические методы (спектрофотометрический метод, хроматографический метод, электрофоретический метод) для изучения динамики ферментативной активности в условиях гипоксии и при выходе из нее, а также физико-химических и кинетических свойств очищенных ферментативных препаратов ЛДГ и ЛЦО-подобной ГО. Используются молекулярно-биологические методы (метод ПЦР-РВ) для установления уровня экспрессии генов изучаемых ферментов при воздействии гипоксии и при выходе из нее.

изложены пути последовательной модификации фермента ЛЦО бактерий в ЛЦО-подобную гликолатоксидазу в линии растений.

раскрыты кинетические параметры реакции ферментов метаболизма лактата: установлены низкие значения константы Михаэлиса к субстрату пирувату для ЛДГ из листьев и корней гороха, которые составили соответственно 15 мкМ и 35 мкМ, что обуславливает высокую субстратную специфичность и протекание процесса гликолиза при недостатке кислорода. В то же время для фермента ЛЦО-подобной гликолатоксидазы листьев сорго установлено низкое значение (0,14 мМ) константы Михаэлиса к субстрату лактату. Данный показатель ниже, чем у классических фотореспираторных гликолатоксидаз (2,7-4,9 мМ для разных изоферментов гликолатоксидазы арабидопсиса), что позволяет растениям сорго быстро утилизировать накопившийся во время гипоксического воздействия лактат.

изучено влияние величин рН и температуры на кинетику ферментативных реакций с участием ферментов ЛДГ и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы. Показатель оптимальной величины рН для ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев C_4 -растения сорго выше по сравнению с таковым же показателем для фермента из гороха (7.5 против 7.2). А оптимальное значение температуры для работы ЛЦО-подобной гликолатоксидазы, экстрагированной из листьев сорго, составило 55⁰С, что является более высоким показателем по сравнению с таковым для фермента из листьев гороха, составившим 48⁰С.

проведена модернизация способа очистки ферментативных препаратов из растений. Благодаря использованию ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефацеле, выявлено, что наиболее высокая активность ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев гороха была десорбирована с носителя элюцией 175 мМ хлоридом натрия, а из корней - 150 мМ хлоридом натрия.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработан и внедрен модифицированный метод очистки ферментативных препаратов лактатдегидрогеназы и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев и корней гороха, а также ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из корней сорго.

определены биохимические характеристики очищенных препаратов ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из двух видов сельскохозяйственно-важных культур – гороха и сорго, которые могут иметь потенциал для биотехнологических разработок.

создана гипотетическая схема реакции регуляции функционирования лактатдегидрогеназы и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы на энзимологическом и экспрессионном уровнях в листьях гороха и сорго в гипоксических условиях и при переходе к нормоксии.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

для экспериментальных работ результаты воспроизводимы, получены на сертифицированном оборудовании, подвергнуты статистической обработке при использовании лицензионных компьютерных программ.

теория построена на новых экспериментальных данных и согласуется с опубликованными экспериментальными результатами по исследованиям механизма регуляции метаболизма лактата при адаптивных реакциях.

идея базируется на анализе полученных экспериментальных данных и практике мирового опыта по изучению влияния гипоксии на биохимико-физиологические процессы у растений.

использованы сравнения авторских результатов и данных, полученных ранее при изучении механизмов, обеспечивающих транскрипцию генов *ldh* и *glo* у растений.

установлено, что полученные автором результаты согласуются с имеющимися данными по изучению влияния гипоксии на метаболизм лактата у растений.

использованы современные методики сбора и математической обработки исходной информации, обоснован подбор объектов наблюдения и измерения.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии автора в разработке программы исследований, постановке и проведении лабораторных экспериментов, статистической обработке и интерпретации экспериментальных

данных по изучению метаболизма лактата на примере растений гороха и сорго, модификации метода очистки ферментативных препаратов, и подготовке публикаций по выполненной работе. Материалы диссертации были доложены: на Всероссийских и Международных научно-практических конференциях.

Диссертация охватывает основные вопросы поставленной научной задачи и соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается наличием последовательного плана исследования, непротиворечивой методологической платформой, концептуальностью и взаимосвязью выводов.

В ходе защиты диссертации критических замечаний не было.

Соискатель Комарова Н.Р. ответила на задаваемые в ходе заседания ей вопросы и привела собственную аргументацию выводов для исследования.

На заседании 12.05.2022 г. диссертационный совет принял решение: за решение научной задачи по изучению биохимических и молекулярных механизмов регуляции энзимов, метаболизирующих лактат и пируват в растениях с разным типом обмена веществ при гипоксии, имеющей значение для развития биохимии и физиологии растений, присудить Комаровой Н.Р. ученую степень кандидата биологических наук

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 11 докторов наук (по специальности 1.5.4 – 8, и по специальности 1.5.21 – 3), участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовали «за» - 16, «против» - нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель
диссертационного совета

Ученый секретарь
диссертационного совета



Артюхов Валерий Григорьевич

Грабович Маргарита Юрьевна

« 12 » мая 2022 г.