

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Г. Б. Анохиной "Анализ механизмов действия стрессовых факторов на функционирование ферментов метаболизма 2-оксоглутарата в листьях кукурузы ", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия и 1.5.21 – физиология и биохимия растений.

Диссертационная работа Г.Б. Анохиной выполнена на кафедре физиологии и биохимии растений Воронежского государственного университета. Она сконцентрирована на актуальной проблеме физиологической роли метаболизма 2-оксоглутарата в листьях кукурузы – одного из представителей C₄-растений – и взаимоотношения этого ключевого хаба митохондриального дыхания и азотного обмена с факторами окружающей среды (свет, гипоксия, засоление).

Диссертация построена по традиционной схеме, хорошо оформлена. Она занимает 169 страницы, иллюстрирована 74 рисунками и 14 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, двух глав, посвящённых методам и результатам исследований, заключения и выводов. В отдельной главе достаточно подробно описаны объекты и методы исследований. Одна большая глава с тремя подразделами посвящена описанию результатов экспериментов, их анализу и интерпретации. Список цитируемой литературы насчитывает 203 работы.

Теоретический анализ существующей научной литературы проведен автором в строгом соответствии с собственными исследовательскими планами.

Проанализирована информация как необходимого количества классических публикаций, так и большого количества самой свежей научной литературы.

Последовательно рассматриваются структурно-функциональные характеристики, кинетические свойства и молекулярно-генетические аспекты функционирования ферментов, участвующих в метаболизме 2-оксоглутарата. Анализируются современные представления о роли 2-ОГ в адаптивной реакции клеточного метаболизма к действию

различных факторов среды таких как солевой стресс, гипоксия и световой режим, то есть всех тех экспериментальных параметров, которые использованы автором в её исследованиях.

Спектр объектов, подобранных автором, очень широк и разнообразен и полностью соответствует поставленным задачам. Эксперименты проводились, главным образом, на растении с C₄-типом фотосинтеза – кукурузе и очень ценно, что автор в качестве дополнительных объектов использовала C₃-злак пшеницу и генетически хорошо паспартизованное растение *Arabidopsis thaliana* L. (дикий тип и ФХ-мутанты). Однако хочу отметить, что интенсивность освещения при выращивании всех растений была, на мой взгляд, слишком низкой. Главная проблема в том, что эта освещённость чуть выше фотокомпенсационного пункта даже для C₃-растений, а для C₄-растения кукурузы может быть и ниже ФКП.

Необходимо так же отметить большое разнообразие использованных автором постановочных схем экспериментов (солевой и гипоксический стрессы, свет различного спектрального состава), экспериментальных приемов и аналитических методов от выделения, очистки и измерения активности большой группы ферментов до разнообразных приёмов работы с нуклеиновыми кислотами, что является гарантией надёжности полученных результатов и корректности их анализа и интерпретации.

В отношении одной группы препаративных методов хочется сказать особо. Получение с помощью механического разрушения листьев ферментных препаратов, митохондрий и особенно хлоропластов для кукурузы должно быть оговорено отдельно. Это связано с тем, что в этом объекте мы имеем два типа фотоавтотрофных тканей: КПО и мезофилл, и, соответственно, заметно отличающиеся органеллы и ферментные ансамбли. Почему выбран механический приём, а не более «чисто» работающий ферментативный, понять можно: он дешевле и быстрее. Но в любом случае желательно

привести пояснения о том, что содержалось в гомогенатах листьев кукурузы: только мезофильная фракция или в какой-то степени и КПО. Экспериментальные данные, во всех случаях полученные в результате достаточного количества как биологических, так и аналитических повторностей, обработаны адекватными статистическими методами. Поэтому достоверность и значимость полученных автором результатов не вызывает сомнений.

Исследовательский раздел диссертации логически четко структурирован и представлен тремя крупными блоками, внутри которых ферменты изучены по одинаковым методическим схемам с небольшими вариациями. Это представляется мне стратегически очень правильным и продуктивным приёмом.

В первой экспериментальном подразделе автором представлены результаты многостороннего изучения влияния солевого стресса на ключевые ферменты метаболизма 2-оксоглутарата: 2-ОГ-дегидрогеназного комплекса и его компонентов, глутаматдегидрогеназы, сукцинатсемиальдегиддегидрогеназы и оксидитратдегидрогеназы. Существенно, что в отношении каждого из перечисленных ферментов в той или иной степени были проведены комплексные исследования, включающие определение его локализации (цитоплазма/митохондрии/хлоропласты), измерение ферментативной активности (за исключением ССАДГ), некоторых молекулярно-кинетических свойств (K_m , pH-оптимум). Очень важным компонентом, на мой взгляд, являются выполненные автором молекулярно-генетические эксперименты по мониторингу зависимости экспрессии генов того или иного фермента от действия стрессора. Если первая группа экспериментов позволила достоверно установить сам факт изменения активности ферментов и его динамику, то вторая уже дала возможность автору иметь твердые основания для прояснения молекулярных механизмов этого процесса. В результате выполнения всего рассмотренного комплекса

исследований была выявлена регуляторная роль метилирования отдельных CpG-динуклеотидов в составе промоторов.

Исследование зависимости функциональной активности комплекса дыхательных ферментов от ещё одного стрессора – гипоксии – имеет особое значение, поскольку можно полагать, что он имеет более прямое и гибкое регуляторное влияние на дыхательный метаболизм, чем солевой стресс. Автор убедительно доказал, что гипоксия изменяет активности 2ОГДК и ГДГ противоположным образом (кстати, в автореферате в подписи к Рис 11А допущена ошибка), что, очевидно, может приводить к значимому перераспределению потока углерода в стрессовой ситуации по сравнению с нормой. И в случае гипоксии автору удалось убедительно доказать, что регуляция происходит на уровне экспрессии соответствующих генов через эпигенетический механизм метилирования CG-динуклеотидов промотора. При сравнении двух, казалось бы, столь различных стрессоров обнаруживается значительное сходство механизмов их действия при определённом различии конечных результатов. Это даёт возможность говорить, что автору удалось экспериментально показать наличие генерализованного адаптационного синдрома (ГАС) у растений на метаболическом уровне.

Третий крупный блок исследований, осуществлённый Галиной Борисовной, посвящён влиянию на метаболизм 2-ОГ фактора более таргетированного эффектора, чем стресс-факторы, а именно света с различной длиной волны, мишенями которых являются конкретные молекулярные структуры: фитохромы (КС/ДКС) и криптохромы (СС). На основе полученных данных автор разработала непротиворечивую схему регуляции функционирования ферментов метаболизма 2-оксоглутарата с участием фитохрома А. На мой взгляд, важно ещё и то, что в связи с возможностью фитохромной регуляции были проведены исследования, показавшие участие в них концентрационных трансформаций ионов кальция. Это согласуется с многими данными в мировой научной литературе, что для кандидатской диссертационной

работы можно считать положительным фактом. Для гена *ogdh-1* показан криптохром-зависимый механизм регуляции его функционирования. В результате большой комплексной экспериментальной и аналитической работы автор сконструировал достаточно ёмкие и в то же время непротиворечивые гипотетические схемы регуляции функционирования ферментов, метаболизирующих 2-оксоглутарат в листьях кукурузы, при гипоксии (Рис. 19) и при различных световых режимах (Рис. 20).

В завершение хочу подтвердить, что рассматриваемая нами диссертация представляет собой цельное, завершённое исследование, несущее в себе как определённый объём новых знаний в области физиологии и биохимии растений, так и практический потенциал.

Материалы диссертации полностью опубликованы в 8 статьях, рекомендованных ВАК, публично представлены и апробированы в научных дискуссиях на более чем десяти международных и российских конференциях. Автореферат полно и адекватно отражает содержание диссертации.

В связи со всем вышесказанным считаю, что данная работа отвечает всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а Галина Борисовна Анохина достойна присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности «биохимия» – 1.5.4 и «физиология и биохимия растений» – 1.5.21.

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Группы экологии и физиологии
фототрофных организмов,
ФГБУН ФИЦ «Пушкинский центр
биологических исследований»
Российской академии наук, ИФПБ



В. Ю. Любимов

25 августа 2022 г.

Почтовый адрес:
142290, Московская область, г.
Пушино, ул. Институтская д.2.
Телефон: +7(4962) 733 601
lvyu99@mail.ru

