

ОФИЦИАЛЬНЫЙ ОТЗЫВ ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Бердниковой Ольги Сергеевны
«Воздействие гипоксии и среды высоких концентраций CO₂ на образование
активных форм кислорода в клетках различных по устойчивости растений»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.04 – Биохимия

Диссертационная работа О.С. Бердниковой посвящена выявлению изменений в редокс-гомеостазе, индуцированных воздействием гипоксии и среды, содержащей высокие концентрации CO₂, в растениях, различающихся по устойчивости к недостатку кислорода. Несмотря на длительную историю изучаемого вопроса, появляющиеся в настоящее время новые данные о молекулярных механизмах действия гипоксии и аноксии расширяют наше знание о формировании устойчивости растений. Усиленное образование активных форм кислорода (АФК) является универсальной стрессовой реакцией живых организмов и происходит, в том числе, при гипоксии/реоксигенации. Вопросы о происхождении и молекулярных механизмах действия АФК при стрессе продолжают оставаться дискуссионными. В связи с этим, актуальность работы О.С. Бердниковой не вызывает сомнений.

В диссертационной работе О.С. Бердниковой исследуется интересная взаимосвязь между редокс-статусом, гормонами и устойчивостью растений к недостатку кислорода. Диссертационная работа О.С. Бердниковой состоит традиционно из введения, обзора литературы, экспериментальной части, заключения, выводов и списка литературы.

Во Введении описана актуальность проблемы, цель и задачи исследования, научная и практическая новизна, положения, выносимые на защиту. К сожалению, во Введении не обоснованы некоторые важные аспекты исследования, например, необходимость изучения влияния фитогормонов в условиях гипоксического стресса, выбор липоксигеназы для более подробного анализа.

В обзоре литературы освещается современное состояние проблемы. Описаны особенности действия недостатка или отсутствия кислорода на жизнедеятельность растений. Автор демонстрирует свою эрудицию, особое внимание он уделяет обзору особенностей образования, токсического действия и механизмов детоксикации АФК. Наиболее удачными представляются главы, посвященные анализу особенностей гипоксического стресса и защитных механизмов у растений. В качестве замечания можно отметить, что в некоторых главах даются слишком общие, неточные представления, в частности, о механизмах образования АФК. Так, глава 1.2. обзора литературы называется «Липоксигеназы и их роль в образовании АФК в растениях», однако кроме утверждения о том, что липоксигеназы могут окислять жирные кислоты до гидропероксидов, информации о химизме образования гидропероксидов, их превращений в другие виды АФК не представлено. Подобное замечание можно

сделать и по главе 1.3., которая посвящена образованию АФК в клеточных органеллах.

Экспериментальная часть начинается с описания объектов и методов, использованных автором. Несомненным методическим достоинством работы О.С. Бердниковой является проведение сравнительного анализа эффектов гипоксии на растения, различающиеся по устойчивости к действию этого стрессового фактора. Анализ содержания АФК и активности ферментов проведен с использованием разнообразных классических методов биохимии: определение содержания различных АФК, анализ активности антиоксидантных ферментов, выделение клеточных органелл.

При чтении диссертации у меня возник ряд методических вопросов.

1) Работа с отсеченными проростками, использованными в качестве объектов исследования в данной диссертации, должна учитывать эффекты не только гипоксического, но и раневого стресса. Так, в работе Huang et al. (2005) отсеченные гипокотили риса выдерживались в течение 5 часов для восстановления клетками потерянных при раневом стрессе ионов калия. Динамика раневого стресса у растений изучена довольно подробно, в том числе, работами Л.Х. Гордона. Учитывали ли эффекты отсечения от проростков корней и семядолей, особенно в начальный период стресса?

2) Известно (это отмечается и в диссертации), что реоксигенация после гипоксии и аноксии может оказывать значительные токсические эффекты, и в том числе, стимулируя образование АФК. Каким образом предотвращали реоксигенацию при подготовке растительного образца (гомогенизация) после воздействия газовых сред растения?

3) Каким образом рассчитывали содержание АФК и активность ферментов в хлоропластах и митохондриях? В методике было бы более логичным указать количество добавленного белка, а не объем образца, поскольку в результатах расчет приводится на мг белка.

4) В работе с выделенными органеллами методика их выделения является очень критичным аспектом. Описанная в диссертации методика является недостаточной для выделения чистой фракции нативных митохондрий. Как правило, в современных исследованиях используют систему разделения этих органелл в градиентах плотности и последовательного центрифугирования для очищения митохондрий от других частиц и сопутствующих органелл, например, пероксисом, которые, несомненно, вносят значительный вклад в образование АФК. Проводилось ли измерение активности маркерных ферментов других органелл, кроме митохондрий?

5) При электрофоретическом разделении белков и визуализации липоксигеназы использование лишь двух маркерных белков представляется недостаточным. Кроме того, было ли проведено подтверждение специфичности окрашивания, например, с применением ингибитора липоксигеназ?

В диссертационной работе О.С. Бердниковой получены оригинальные экспериментальные данные. Среди результатов хотелось бы отметить проанализированную автором взаимосвязь окислительного статуса, эффектов фитогормонов кинетина и эпибрассинолида и активности ряда редокс-ферментов при действии гипоксии в растениях, различающихся по чувствительности и устойчивости к недостатку кислорода. Индукция гипоксического стресса в растениях производилась при действии различных газовых сред, в том числе CO_2 . Дальнейшие исследования эффектов CO_2 представляются особенно интересными и перспективными.

В качестве основных замечаний можно высказать следующее. Во-первых, к сожалению, в диссертации не представлены параметры, на основании изменений которых можно делать выводы о стрессовом состоянии растений, в целом, и гипоксическом стрессе, в частности. В обзоре литературы автором отдельная глава посвящена метаболическим механизмам адаптации растений к гипоксии. Проницаемость мембран, скорость и эффективность фотосинтеза и дыхания, метаболические маркеры гипоксической адаптации или чувствительности, такие как уровень аланина и других интермедиатов цикла Кребса – знание этих параметров могло бы придать большую убедительность заключениям автора.

Во-вторых, принципиальным является вопрос о вкладе липоксигеназы митохондрий в образование АФК. Автор выносит на защиту интересное положение (№ 3): «Установлено, что липоксигеназа митохондрий вносит существенный вклад в процессы накопления АФК в клетках растений в первые часы действия гипоксического стресса». Утверждение очень смелое, однако, на мой взгляд, доказательства для такого утверждения в диссертации О.С. Бердниковой не представлены. Наличие совпадения во времени изменений уровня АФК и активности липоксигеназы недостаточно. Известны различные потенциальные АФК-генерирующие ферментные системы у растений. Так, в митохондриях растений оксидоредуктазы комплексов I и III вносят большой вклад в образование АФК. В митохондриях существуют и другие редокс-ферменты, которые потенциально могут вносить вклад в образование АФК. Кроме того, известно, что в растениях семейства бобовых одним из наиболее активных ферментов, продуцирующих H_2O_2 , является аминоксидаза (например, статьи Rea et al., Roach et al. и другие). Это же показано и для кукурузы (например, статьи Cona et al.). К сожалению, эта информация осталась без обсуждения.

Диссертация написана хорошим литературным языком, последовательность изложения результатов и их обсуждения логически обоснованы. К сожалению, работа не лишена технических недочетов. Так, на мой взгляд, использование словосочетания «молекулярная форма липоксигеназы» представляется неудачным, лучше использовать «изоформа липоксигеназы». Кроме того, неправильно говорить о «реакции растений на стресс» (например, на с. 43), поскольку реакция растений на действие стрессового фактора и есть стресс. Совершенно непонятным осталось оформление списка литературы, не прослеживается система ни по

хронологии появления в тексте, ни по алфавиту. Различные ссылки оформлены по-разному, что, впрочем, может являться следствием особых требований к оформлению литературы. Однако эти недочеты и высказанные замечания не умаляют достоинств работы. Оценивая диссертационную работу О.С. Бердниковой в целом, необходимо отметить, что она является завершенной научно-квалификационной работой. Экспериментальные данные, полученные О.С. Бердниковой, имеют фундаментальное и прикладное биологическое значение, выводы вытекают из полученных экспериментальных данных. Полученные результаты могут быть использованы в биологических, сельскохозяйственных, биотехнологических научных институтах, а также в ВУЗах при чтении курсов по физиологии и биохимии растений, биотехнологии, стрессологии. Автореферат и опубликованные работы отражают приведенные в диссертации результаты. Считаю, что диссертационная работа О.С. Бердниковой соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям в соответствии с пунктом 8 «Положения о порядке присуждения ученой степени», а ее автор Бердникова Ольга Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Заведующий лабораторией
окислительно-восстановительного метаболизма
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки
Казанский институт биохимии и биофизики
Казанского научного центра Российской академии наук,
доктор биологических наук

Фарида Вилевна Минибаева

420111, г. Казань
ул. Лобачевского 2/31
Тел.: (843)2319045
E-mail: minibayeva@kibb.knc.ru

17.01.2016

*Подпись зав. лабораторией, д.б.н.
Минибаева Ф.В. вверяю
Зам. проректора по научной работе
Серков В.М.*