

## ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата биологических наук, доцента кафедры  
медицинской биохимии и микробиологии Воронежского государственного

университета Сафоновой Ольги Анатольевны

на диссертацию Бердниковой Ольги Сергеевны «Воздействие гипоксии и  
среды высоких концентраций  $\text{CO}_2$  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 Бердниковой Ольги Сергеевны посвящена изучению процессов образования активных форм кислорода и контроля над протеканием этих реакций в клетках различных растений, подвергшихся действию дефицита кислорода, что представляется весьма актуальным. В отличие от животных, процессы свободнорадикального окисления у растений недостаточно исследованы, особенно в условиях гипоксического стресса. В связи с этим, данная диссертационная работа вносит вклад в выяснение особенностей воздействия кратковременной (до суток) гипоксии и  $\text{CO}_2$ -среды на процессы ферментативного и неферментативного образования активных форм кислорода в растениях с разной степенью устойчивости. В частности, в работе проанализировано изменение активности липоксигеназы, участвующей в накоплении данных высокорекреационноспособных частиц в клетках растений, при действии кратковременной гипоксии и  $\text{CO}_2$ -среды. Автором также было проведено исследование функционирования ферментов антиоксидантной защиты, таких как супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, аскорбатпероксидаза.

К достоинствам работы может быть отнесено то, что впервые методом электрофореза в проростках гороха и сои показано присутствие митохондриальной липоксигеназы, которая отличалась от хлоропластной и цитоплазматической форм по величине  $R_f$ . В ходе проведенных

экспериментов было отмечено, что высокие концентрации  $\text{CO}_2$  значительно усиливали как накопление разных типов активных форм кислорода, так и повышали активность супероксиддисмутазы, каталазы, общей пероксидазы и аскорбатпероксидазы, в отличие от условий обычной гипоксии.

Полученные автором результаты имеют важное практическое приложение. Так, исследование изменения активности антиоксидантных ферментов у растений можно рекомендовать для оценки степени их устойчивости к стрессовым факторам, включая и дефицит кислорода. Практическая значимость диссертационной работы также заключается в отработке методик по изучению содержания различных типов активных форм кислорода (супероксидного анион-радикала, гидропероксида, пероксида водорода) в тканях и отдельных клеточных компартментах растений с использованием методов хемилюминесценции и спектрофотометрии. Полученные результаты, свидетельствующие о способности фитогормонов кинетина и эпибрассинолида снижать интенсивность свободнорадикального окисления в клетках растений, могут быть использованы в растениеводстве при решении проблемы повышения устойчивости растений к действию гипоксического стресса.

Диссертационная работа Бердниковой Ольги Сергеевны «Воздействие гипоксии и среды высоких концентраций  $\text{CO}_2$  на образование активных форм кислорода в клетках различных по устойчивости растений» изложена на 170 страницах текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы (264 источника). Иллюстративный материал включает 22 рисунка и 13 таблиц, а также 8 таблиц в Приложении.

Необходимо отметить, что в диссертационной работе представлен достаточно подробный литературный обзор, в котором обобщены данные о механизмах образования и биологической роли активных форм кислорода в клетках растений, рассмотрена информация о роли фермента липоксигеназы в генерации активированных кислородных метаболитов, представлены

сведения об антиоксидантной системе клеток, включающей ферменты и низкомолекулярные вещества. В литературном обзоре также расшифровано понятие гипоксического стресса и описаны анатомо-морфологические и метаболические механизмы адаптации растений к дефициту кислорода. Отдельно приведены имеющиеся данные по действию высоких концентраций углекислого газа на метаболические процессы растений. Также автором представлена информация о роли фитогормонов в устойчивости растений к стрессам.

Хорошее впечатление оставляет глава с подробным описанием объектов и методов исследования, что позволит легко воспроизвести проводимые автором эксперименты. В работе были применены адекватные поставленным задачам методы физико-химической биологии. Так, для исследования интенсивности свободнорадикального окисления был использован метод биохемилюминесценции. Продукция супероксидного анион-радикала, гидропероксидов, пероксида водорода, активность липоксигеназы, а также антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы, каталазы, общей пероксидазы и аскорбатпероксидазы была определена с помощью спектрофотометрического метода. Доказательство определения в пробах именно супероксидного анион-радикала было подтверждено автором с использованием фермента супероксиддисмутазы, который ингибировал его образование на 80-95%. Использование метода дифференциального центрифугирования позволило Бердниковой О.С. получить клеточные фракции митохондрий, хлоропластов и цитоплазмы из растений гороха, сои и кукурузы с высокой степенью чистоты, которая была определена по активности маркерного фермента митохондрий сукцинатдегидрогеназы и по содержанию хлорофилла. Автором отработана методика электрофоретического исследования липоксигеназы в пробах и специфическое окрашивание с применением линолевой кислоты в качестве субстрата. Впервые с использованием электрофореза в полиакриламидном геле было показано присутствие липоксигеназы как в цитоплазме,

хлоропластах, так и в митохондриях клеток проростков гороха и сои. Таким образом, использованные в диссертационной работе методы позволили провести исследование на высоком научно-методическом уровне, что отвечает современным требованиям биохимии.

Результаты исследования, приведенные в диссертации, посвящены изучению влияния различных газовых сред на процессы образования активных форм кислорода в клетках отличающихся по устойчивости растений при разных сроках воздействия. Отмечена более высокая скорость процессов свободнорадикального окисления и образования данных частиц в тканях менее устойчивых проростков гороха, в отличие от среднеустойчивых растений сои и кукурузы, при кратковременной гипоксии и среды  $\text{CO}_2$ . Изучена активность липоксигеназы растений в условиях разных газовых сред в тканевых гомогенатах и отдельных органоидах. В результате проведенных исследований автором было установлено, что липоксигеназный путь накопления активных форм кислорода был одинаково эффективным в митохондриях как проростков гороха, так и сои и кукурузы, но только в первые часы действия условий гипоксии и  $\text{CO}_2$ -среды.

Бердниковой О.С. было обнаружено, что в клетках более устойчивых проростков сои активность каталазы в первые часы действия гипоксии возрастала почти в десять раз, в отличие от неустойчивых растений гороха. В дальнейшем функция защиты от избыточного образования активных форм кислорода в клетках растений переходила к ферментам пероксидазной группы, таким как общая пероксидаза и аскорбатпероксидаза, что подтверждалось повышением их активности. Показано, что при обработке растений гороха и сои эпибрассинолидом существенно подавлялись (в 1,5-2 раза) процессы образования пероксида водорода при действии как гипоксии, так и среды  $\text{CO}_2$ . Предобработка растений гороха, сои и кукурузы кинетином также приводила к уменьшению концентрации пероксида водорода в различных условиях эксперимента. Так как основными источниками образования активных форм кислорода в клетках растений являются

митохондрии и хлоропласты, автором было проведено изучение действия гипоксического стресса на скорость образования различных типов этих реакционноспособных частиц, а также активность липоксигеназы и супероксиддисмутазы в данных клеточных компартментах. Было отмечено, что в митохондриях гороха через 3 часа действия гипоксии происходило существенное накопление супероксидного анион-радикала, а в растениях сои это наблюдалось только к 6 часам. Активность фермента супероксиддисмутазы при этом в митохондриях клеток сои возрастала уже с первых часов действия гипоксии, а в митохондриях менее устойчивых растений гороха только к 24 часам.

Таким образом, полученные автором данные вносят вклад в развитие представлений о механизмах образования активных форм кислорода в клетках растений в условиях гипоксического стресса и путей их детоксикации. Представленные Бердниковой Ольгой Сергеевной выводы отражают содержание диссертационной работы.

В то же время работа не лишена и некоторых недостатков:

1. Автором диссертации не было акцентировано внимание на причинах выбора кинетина и эпибрассинолида для проведения исследований, а также использованной в экспериментах дозы фитогормонов.
2. Исследование влияния гипоксии не только на активность ферментов антиоксидантной защиты, но и на содержание низкомолекулярных антиоксидантов в растениях позволило бы получить более широкое представление о механизмах защиты клеток от избытка активных форм кислорода в данных условиях.
3. Автором в диссертационной работе не предлагается возможная схема влияния условий гипоксии и  $\text{CO}_2$ -среды на процессы образования активных форм кислорода в клетках растений, хотя механизмы процессов обсуждаются в самой работе.

Однако, несмотря на сделанные замечания, работа представляется новой, интересной и проведенной на высоком научно-методическом уровне.

