

**Отзыв официального оппонента на диссертацию
на соискание ученой степени доктора биологических наук
Птушенко Василия Витальевича на тему: «Фотозащита кислородных
фототрофных организмов при действии стрессовых факторов различной
природы» по специальностям 1.5.2. — Биофизика
1.5.21. — Физиология и биохимия растений**

Диссертационная работа Птушенко Василия Витальевича посвящена обнаружению ключевых адаптационных механизмов, функционирующих в клетках кислородных фототрофных организмов при действии различных стрессовых факторов. Роль фотосинтеза для жизни растений определяет важность быстрой адаптации фотосинтетического аппарата к изменениям окружающей среды. Известно, что растения способны выживать в определенном диапазоне изменений внешних условий. По мере отклонения от оптимума в клетках включаются защитные механизмы, позволяющие до определенного уровня противостоять действию неблагоприятных внешних факторов. При этом, морфологические, биохимические и молекулярно-генетические адаптационные изменения в фотосинтезирующей клетке в стрессовых условиях кардинальным образом сказываются на функциональной активности растений. Однако универсальные механизмы адаптации, направленные на обеспечение оптимального функционирования клетки в разных условиях, все еще не до конца расшифрованы. Изучению именно этой проблемы посвящена диссертационная работа Птушенко Василия Витальевича.

В диссертационной работе Василия Витальевича рассматриваются фундаментальные основы функционирования и механизмы приспособления кислородных фототрофных организмов к окружающей среде на различных уровнях клеточной организации, в связи с чем актуальность выбранной темы диссертации не вызывает сомнений. Цель исследования достаточно ясно сформулирована. Выяснение общих и специфических фотозащитных

механизмов у различных кислородных фототрофных организмов в разных условиях среды представляет научную новизну диссертационной работы.

Учитывая многообразие стрессовых факторов и непредсказуемый синергетический эффект от их сочетания, в настоящее время представляется актуальным поиск решений, направленных на повышение устойчивости организмов за счет усиления биосинтеза естественных компонентов клетки; одним из таких компонентов для представителей зеленых водорослей, согласно положениям, выносимым на защиту в диссертационной работе, может быть белок PsbS фотосистемы 2.

Представленная работа, согласно вышесказанному, имеет теоретическую и практическую значимость и характеризуется научной новизной. Научные положения, выносимые на защиту, являются обоснованными. Выводы достоверны.

Диссертация Птушенко В. В. изложена на 222 страницах и содержит 90 рисунков и 9 таблиц. Диссертация включает 9 глав, в том числе обзор литературы, описание методов исследования и результаты работы, обсуждение, выводы, список цитируемой литературы из 265 наименований, а также приложение.

Во введении обосновывается актуальность и формулируются цели исследования, отмечается научная новизна работы и выносимые на защиту научные положения.

Литературный обзор (глава 1) содержит необходимую для понимания современного состояния проблемы информацию. Описаны существующие в литературе представления о ряде механизмов защиты фотосинтезирующих организмов от избыточного освещения, таких как тепловая диссипация энергии возбужденных состояний хлорофилла *a* посредством функционирования каротиноидов, а именно зеаксантина и лютеина, а также белков PsbS или LhcSR фотосистемы 2, что измеряется путем оценки нефотохимического тушения (НФТ) флуоресценции хлорофилла *a*

фотосистемы 2 при комнатной температуре. Представлен механизм фотоиндуцированных изменений пространственного распределения хлоропластов в клетке и проанализированы данные о протекании данного процесса у разных видов растений. Кроме того, обсуждается экологическая специфичность выбора организмами стратегий защиты от избыточного освещения.

Методический арсенал представленной работы, описанный в главе 2, обширен. Подробно описаны применяемые в диссертационной работе методы, включая ЭПР-спектроскопию, электронную и оптическую микроскопию, методы высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии, редокс-титрование, рН-метрию, измерение скорости транспирации и ассимиляции CO_2 в листе и др.

Важно отметить, что Василием Витальевичем разработан оригинальный метод расчета окислительно-восстановительных и кислотно-основных свойств групп (аминокислотных остатков или кофакторов) в белках, основанный на применении методов полумакроскопической электростатики, в том числе численных методов решения уравнения Пуассона-Больцмана для анализа электрического взаимодействия этих групп с белковым окружением.

Глава 3 (первый раздел результатов) посвящена изучению влияния низкой положительной температуры на фотосинтетическую активность зелёных водорослей. Показано, что действие низкой температуры частично имитирует действие повышенной освещенности, а именно приводит к снижению активности фотосинтетического аппарата и индукции НФТ, при этом происходит существенный рост экспрессии генов, кодирующих белки LhcSR и PsbS, ответственных за индукцию НФТ. В работе В.В. Птушенко впервые показано, что увеличение экспрессии PsbS и уровня НФТ может быть одним из основных долговременных, до нескольких суток (а не кратковременных, как это было показано ранее), ответов на действие изучаемого стрессового фактора у зелёных водорослей. Более того, с

применением разработанного метода расчета впервые проведена оценка величин pK_a для протонируемых аминокислотных остатков белка PsbS одноклеточной эукариотической водоросли *Lobosphaera incisa* (*L. incisa*). Для этого в диссертационной работе определена аминокислотная последовательность и предсказана трехмерная структура PsbS белка; на основании структуры построена молекулярно-динамическая модель и выполнен расчет значений pK_a протонируемых групп белка. Были выявлены два аминокислотных остатка PsbS белка, Glu-87 и Lys-196, обладающие значениями pK_a в слабокислом диапазоне. Учитывая, что активация PsbS белка индуцируется закислением люмена тилакоидов и, следовательно, зависит от протонирования экспонированных в люмен аминокислотных остатков, полученные данные расшифровывают механизм функционирования PsbS белка у зеленых водорослей, а именно впервые выявляют pH-чувствительные группы белка, ответственные за функциональную активность этого белка. Это один из основополагающих результатов диссертационной работы.

Главы 4 – 6 посвящены изучению приспособления фотосинтетического аппарата к изменению интенсивности освещения и спектрального состава света, а также газового состава среды. Известно, что повышение уровня освещенности приводит к повышению диссипации энергии в тепло. В диссертационной работе Василий Витальевич, проанализировав поведение растений из разных групп в разных условиях среды, установил, что индукция НФТ существенно различается у теневыносливых и светолюбивых видов. Изучая акклимационный ответ некоторых видов традесканций на повышение уровня освещенности, обнаружено, что, помимо индукции НФТ, перераспределение хлоропластов в клетках мезофилла представляет собой один из основных механизмов приспособления к условиям освещения.

Показана энергетическая роль желто-зелёного света, основанная на обеспечении протекания фотосинтеза в нижних слоях мезофилла и в листьях нижних ярусов, что, по-видимому, обусловлено меньшим поглощением

хлорофиллом этой спектральной компоненты и, как следствие, более глубоким проникновением как вглубь листа, так и вглубь листовой кроны растения в целом.

Автором сделан вывод, что устойчивость организмов к повышенной концентрации углекислого газа в воздухе может быть опосредована устойчивостью организмов к закислению среды. Кроме того, получены весьма интересные результаты, свидетельствующие о снижении негативного влияния анаэробных условий на квантовый выход фотосистемы 2 при повышении концентрации CO_2 в среде; при этом, при добавке CO_2 не наблюдается рост теплового рассеяния поглощённой энергии, который был зарегистрирован в условиях недостатка кислорода.

В главе 7 и 8 представлены данные об индукции т.н. светового стресса в растениях в природных климатических условиях, в присутствии загрязняющих веществ или в присутствии экзогенных антиоксидантов. Выявлены закономерности влияния возраста листьев, расстояния произрастания растений вблизи автомагистрали на состояние фотосинтетического аппарата. Обнаружено, что эффективная защита фотосинтетического аппарата у пойкилогидрических организмов, способных функционировать при недостатке воды, может обеспечиваться поддержанием активной диссипации энергии в тепло, несмотря на снижение содержания фотосистем. Предположено, что негативное действие проникающих антиоксидантов, молекулы которых представляют собой остаток децилпластохинона с пришитым гидрофобным катионом тетрафенилфосфония (так называемые «ионы Скулачёва»; SkQ), может быть связано с ингибированием кислород-выделяющей активности фотосистемы 2.

Разделы заключение и выводы обобщают результаты диссертационной работы. Из представленных в диссертационной работе данных можно сделать вывод о том, что индукция тепловой диссипации энергии, которая долгое время считалась адаптационным механизмом к повышенной освещенности,

представляет собой один из ключевых универсальных механизмов приспособления кислородных фототрофных организмов к разным условиям окружающей среды.

Полученные в диссертационной работе Василия Витальевича Птушенко результаты опубликованы в серии публикаций в высокорейтинговых журналах (Биохимия, Биофизика, *Physiologia Plantarum*, *Biochemica et Biophysica Acta*, *Frontiers in Plant Sciences*, *International Journal of Molecular Sciences*, *Photosynthesis Research* и др.), которые являются ведущими журналами для исследователей фотосинтеза, физиологии и биофизики растений. Результаты апробированы на всероссийских и международных конференциях, где получили высокую положительную оценку.

У оппонента отсутствуют замечания к основным разделам диссертационной работы, таким как цель, задачи, актуальность, научная новизна, результаты и выводы. Однако при прочтении диссертационной работы возникли некоторые вопросы, требующие комментариев со стороны соискателя:

1. Формулировка цели не совсем корректна. «Цель работы — выяснить роль конкретных фотозащитных механизмов у кислородных фототрофных организмов при световом стрессе, индуцированном стрессовыми факторами различной природы». Световой стресс может быть вызван только действием света, но никак не стрессовыми факторами другой природы. При этом, механизмы адаптации, протекающие при световом стрессе (по крайней мере, обнаруженные впервые в этих условиях), могут запускаться и при действии других факторов. По-видимому, это и имел в виду соискатель.
2. В диссертации достаточно полно и широко представлен обзор литературы в отношении функционирования белков PsbS и LhcSR при повышенной освещенности. Рассмотрены другие (к сожалению, в недостаточной степени) адаптационные механизмы, которые инициируются при

повышенной освещенности. Однако не приводятся литературные данные о механизмах приспособления фототрофных организмов к иным факторам стресса, в частности к пониженной температуре, хотя этот аспект проблемы один из основных в диссертационной работе.

3. При упоминании нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a*, общепринято говорить про несколько компонентов НФТ, а не про несколько фаз НФТ.
4. Не в полной мере представлены данные об образовании активных форм кислорода в фотосинтетическом аппарате. Также хотелось бы увидеть больше данных об антиоксидантных системах и их роли в жизнедеятельности кислородных организмов, особенно в стрессовых условиях. Этот аспект особенно важен при изучении влияния экзогенных антиоксидантов на активность изолированных хлоропластов (которые заявлены в диссертационной работе, однако экспериментальные данные не представлены) и клеток микроводорослей (данные представлены в работе).
5. Супероксидный анион-радикал, $O_2^{\cdot-}$, действительно, как справедливо отмечено автором в литературном обзоре, может диффундировать на незначительное расстояние от места образования, однако синглетный кислород, учитывая его высокую реакционную способность в биологической системе, практически не способен на это и вступает в реакцию с биомолекулами в месте своего образования. В этой связи вызывают вопросы литературные источники о возможности диффузии синглетного кислорода на «... заметное расстояние от места образования...» (стр. 15), которые представлены в литературной части диссертационной работы.
6. При работе полной фотосинтетической электрон-транспортной цепи основным местом генерации $O_2^{\cdot-}$ является фотосистема 1, а не фотосистема 2, как указано соискателем в обзоре литературы. При действии стрессовых факторов, а именно в условиях высокой интенсивности света, главным источником $O_2^{\cdot-}$ в тилакоидной мембране

выступает внутримембранный кофактор фотосистемы 1 – восстановленный филлохинон, филлосемихинон (работы Козулевой М.А., Иванова Б.Н., Семенова А.Ю. с соавторами). Кроме того, образование $O_2^{\cdot-}$ может происходить и в пуле пластохинона за счет реакции пластосемихинона с молекулярным кислородом (Khorobrykh, Ivanov, 2002).

7. Неправильно дана ссылка на сигнальную роль пероксида водорода (Khorobrykh et al., 2020). Указанный автор не занимается исследованием сигнальной роли этой молекулы; этим направлением занимаются другие группы (Desikan и др., 2001; Vandenabeele и др., 2003; Apel, Hirt, 2004; Laloï и др., 2006; op den Camp и др., 2003; Chen et al. 2015; Noctor and Foyer, 2017; Borisova-Mubarakshina et al., 2015; и др.).
8. На рисунке III.1 в тексте диссертации и на рисунке 3 в автореферате представлены данные измерения индукционных кривых флуоресценции хлорофилла *a* фотосистемы 2 высокого разрешения (OJIP кривые) при освещении образца в течение 1 сек светом высокой интенсивности. Очевидно, этого времени не хватает для индукции НФТ, поэтому правомерность оценки НФТ таким способом вызывает вопросы. Непонятно также, почему соискатель в данном случае не применил в работе ПАМ-флуориметр, с помощью которого можно достоверно оценить фотохимическое и нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a*. При этом соискатель весьма результативно использовал этот прибор для оценки НФТ в других разделах.
9. Данные в главе 7 о действии проникающих антиоксидантов ставят больше вопросов, чем дают ответов. Негативное влияние добавки SkQ, как показывает сам автор, вызвано наличием в составе ионов Скулачева гидрофобного катиона тетрафенилфосфония и не имеет никакого отношения к антиоксидантной части (децилпластохинону); при этом «наличие антиоксиданта, наоборот, обеспечивает устойчивость фотосинтетического аппарата» (стр. 163 в диссертационной работе).

Однако в автореферате (стр. 37) соискатель утверждает, что «...проникающие антиоксиданты на основе пластохинола могут ингибировать КВК ФСII, причём это ингибирование вызвано именно их антиоксидантными свойствами...».

По тексту встречаются неудачные формулировки: «роль механизмов на избыточное освещение»; «флуоресценция фотосинтетического аппарата», «ингибирование комплекса», «определение содержания определяли» и др. Кроме того, несколько ухудшают положительное восприятие опечатки в тексте (стр. 16, стр. 18, стр. 25, стр. 73, стр. 121, стр. 165 и т.д.).

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Учитывая актуальность, новизну, объем и высокий научный уровень проведенного исследования, можно заключить, что диссертация Птушенко Василия Витальевича отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.2. — Биофизика и 1.5.21. — Физиология и биохимия растений (биол. науки), а также соответствует критериям, определенным пп. 2.1 – 2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно положениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского Государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Птушенко Василий Витальевич заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.2. — Биофизика и 1.5.21. — Физиология и биохимия растений

Ведущий научный сотрудник лаборатории
фотосинтетического электронного

транспорта, зам. директора по научной
работе Института фундаментальных
проблем биологии РАН – Обособленного
подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН

доктор биологических наук

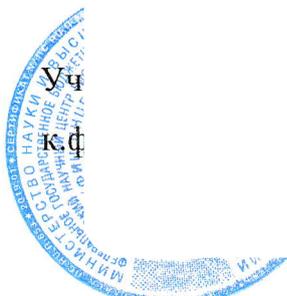
Мария Мансуровна Борисова

Адрес: 142290, г. Пущино, ул. Институтская д. 2

Тел.: +7(4967)73-27-15

E-mail: n

Подпись Борисовой Марии Мансуровны заверяю



Гудков Николай Демьянович

7 марта 2024 года