

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

Актуальность темы исследования. Свет играет ключевую роль в фотосинтезе, участвуя в образовании необходимых для жизни кислорода и органических веществ. Вместе с тем, избыток света несет угрозу накопления активных форм кислорода (АФК), возникновения окислительного стресса и фотодегенерации фотосинтетического аппарата (ФСА). Баланс между поступлением и расходом энергии света нарушается при любых отклонениях от оптимальных условий роста: при колебаниях интенсивности света, чрезмерном охлаждении или нагревании, избытке или недостатке воды (затопление или засуха), нехватке элементов минерального питания, засолении, сдвигах pH среды обитания, при действии загрязнителей и изменениях состава газовой фазы. Выживанию растений в постоянно меняющихся условиях способствуют механизмы адаптации, защищающие ФСА от светового стресса. Способы адаптации имеют как общие фундаментальные черты, так и особенности, связанные со спецификой среды обитания тех или иных растений. Проблема защиты растений от светового стресса в оптимальных и неблагоприятных условиях – крайне актуальна. Её решению посвящены исследования, проводимые в широких масштабах по всему миру. Работа В.В. Птушенко представляет существенный вклад в изучение механизмов защиты водорослей и высших растений от светового стресса. Публикации автора по этой теме в международных журналах с высоким рейтингом можно расценивать как важное научное достижение в области биофизики и физиологии растений. С использованием широкого круга методов, включая анализ флуоресценции (Фл) хлорофилла (Хл), абсорбционную спектроскопию,

ЭПР, биохимические методы, и расчеты электростатических взаимодействий в белках, изучены механизмы защиты ФСА от избытка света при действии стрессоров различной природы в растениях, приспособленных к разным условиям обитания. Разные стратегии адаптации исследованы на отдельных ярких примерах: в одних случаях происходит накопление защитных белков, ответственных за диссипацию возбужденных состояний в тепло, в других – ориентационные движения хлоропластов, снижающие поглощение света. Показаны преимущества слабого поглощения света в зеленой области спектра для повышения продуктивности высших растений. Установлено, что защитное действие проникающих антиоксидантов от окислительного стресса сопряжено с серьезными нарушениями ФСА.

Структура и общая характеристика работы. Диссертация изложена на 222 страницах и открывается традиционными разделами — Введение, Обзор литературы, Материалы и методы. Результаты экспериментов изложены в шести главах, которые начинаются с аннотации и завершаются промежуточными выводами по каждой главе. Кроме того имеется общее Заключение по всей диссертации и главные Выводы, а также Приложение с пояснениями к расчетам электрических взаимодействий в белках ФСА. Автореферат в полной мере отражает основное содержание диссертации. По материалам диссертации опубликованы 28 статей в международных журналах с импакт-фактором до 5.6, индексируемых в базах данных WOS и Scopus.

Материалы экспериментов разделены по главам в соответствии с выбором задач и объектов изучения. Так, влияние низкой температуры на экспрессию фотозащитных белков изучено на холодоустойчивых зеленых водорослях *Lobosphaera*, эффекты реориентации пластид – на четырёх видах традесканции; влияние спектрального состава света – на растениях китайской капусты, эффекты газового состава среды обитания – на водорослях *Desmodesmus* и листьях китайской розы (*Hibiscus*). Влияние городского загрязнения на ФСА изучено на листьях липы, клена и рябины, а влияние проникающих

антиоксидантов – на клетках хлореллы. Растения мха *Physcomitrella* и лишайника *Peltigera* использовали в опытах по влиянию плазмолиза и мацерации клеточной стенки на активность ФСА. В каждой главе обоснован выбор объекта для исследования разных стрессорных воздействий. Все главы связаны общей идеей – принципы защиты ФСА от светового окислительного стресса, но выступают как независимые части исследования.

Известны разные стратегии защиты от фотоокислительного стресса: снижение поглощения света за счет отрицательного фототаксиса подвижных микроводорослей и перемещения хлоропластов (Хп) в клетке, усиление потерь возбужденных состояний в тепло, нейтрализация АФК, а также репарация ФСА. Работа сфокусирована на двух первых механизмах, а именно, на перемещении хлоропластов в клетке и на развитии нефотохимического тушения (NPQ). Основное внимание уделено энергозависимому тушению, которое опосредовано генерацией ΔpH в тилакоидах и ΔpH -зависимой трансформацией каротиноидов.

Содержание диссертации, научная новизна и замечания по разделам.

С учетом построения диссертации, содержание и новизну работы удобнее обсуждать по главам.

В главе 3 прослежена важная роль генов в экофизиологической пластичности растений. Показано, что акклимация зеленой водоросли *Lobosphaera* к температуре 0°C не вызывает изменений в содержании хлорофилла (Хл) и каротиноидов в период от трех до 10 суток, но сопровождается 1000–10000-кратной активацией экспрессии белка PsbS, повышающего тепловую диссипацию возбужденных состояний в ФСА. Это говорит о минорной роли ксантофиллов и о доминирующем значении данного белка в фотозащите ФСА от светового стресса при низких температурах. Прежние представления состояли в том, что экспрессия белка PsbS у водорослей активируется лишь на несколько часов после охлаждения клеток. Получен новый и важный результат, который отражает цепь событий,

связанных с защитой ФСА от окислительного повреждения при охлаждении. Сделан вывод об эволюционно раннем появлении белка PsbS у зеленых растений. На основе трехмерной модели белка PsbS и учета электростатических взаимодействий выявлены остатки аминокислот, способные служить сенсором понижения pH в люмене тилакоидов при избыточной энергизации мембраны. Для этих вычислений было необходимо знать аминокислотную последовательность белка PsbS *Lobosphaera*, но в диссертации не удалось найти, каким образом эти сведения были получены.

Глава 4 – самая большая по объему (40 с) – посвящена изменениям оптических свойств и Фл листьев теневыносливых и светолюбивых видов традесканции. Показано, что изменения оптического пропускания *T* листьев на ярком свете вызваны смещением Хп в клетках листа, что снижает поглощение света, защищая лист от окислительного стресса. Получены новые данные, подтверждающие представления о том, что движения Хп опосредованы рецепторами синего света, а не поглощением хлорофилла. Выявлена специфика изменений NPQ при движении Хп у теневыносливых и светолюбивых видов.

Автор полагает, что в листьях традесканции изменения пропускания *T* уникально велики по амплитуде, но этот тезис неочевиден. Судя по рис. IV.19, изменения *T* в пике поглощения Хл при действии света составляют у традесканции ~0.05 ед., тогда как у арабидопсиса – более 0.2 ед. (Wada 2013, doi: 10.1016/j.plantsci.2013.05.016). Любопытно, что освещение листьев арабидопсиса и папоротника *Adiantum* после предварительного наложения на лист фигурной маски позволяет получить листья с заданным рисунком, причем контраст изображения достигается за счет разного расположения Хп в пределах клетки (Wada 2016, doi: 10.2183/pjab.92.387). Если изменения пропускания *T* листьев традесканции при освещении действительно намного больше, чем у других растений, то стоило привести фотографии листьев, обратимо меняющих окраску. Наглядным примером могут служить различия цвета листьев в утренние и дневные часы у *Selaginella* (doi: 10.1007/s00709-023-01888-w). В

этом плане не стоит ссылаться на большие значения дроби $T_{\text{Light}}/T_{\text{Dark}}$, т.к. для плотных листьев ($T \approx 0$) даже малые по абсолютным значениям ΔT могут сильно менять это отношение.

Неожиданным представляется замечание на стр. 97 о том, что при «...адаптации к свету происходит скоррелированный рост» эффективного квантового выхода ФСII (Φ_{PSII}) и нефотохимического тушения q_{NPQ} . Этот вывод, возможно, применим к какому-то частному случаю, но он не подтверждается другими данными и не согласуется с рис. IV.8, где показано уменьшение Φ_{PSII} при возрастании q_{NPQ} . Вместе с тем, отрицательная корреляция вполне предсказуема, поскольку диссипация электронных возбуждений в тепло снижает использование энергии на перенос электрона по ЭТЦ.

Одно из ключевых положений (на стр. 95-96) основано на анализе изменений фактической Фл Хл после выключения действующего света. Оно состоит в том, что величина темнового овершута флуоресценции ($\Delta F_{\text{AL}}/F_0$) служит показателем градиента рН в тилакоидах. Это представление основано на допущении, что изменения Фл в исследуемый период после затенения обусловлены релаксацией энергозависимого тушения в связи с диссипацией ΔpH . Однако при этом упущено из виду параллельное протекание процессов иной природы, таких как кратковременная активация потока электронов в пул пластохинонов от восстановленных компонентов стромы. В связи с этим в этот период развивается «постсветовое возрастание флуоресценции», которое заметно на рис. IV.6б и IV.6в и которое не вписывается в упрощенную схему определения $\Delta F/F_0$, показанную на рис. IV.6 и IV.11. Судя по своему собственному опыту, постсветовое возрастание Фл F' может намного превышать уровень F_0 . В литературе одним из индикаторов ΔpH считают овершут мембранного электрического потенциала V_m при переходах свет-темнота, измеряемый по электрохромному сигналу ΔA_{515} . В данной работе для доказательства того, что овершут флуоресценции $\Delta F_{\text{AL}}/F_0$ служит показателем

ΔpH , имело смысл показать линейную зависимость между ΔA_{515} и величиной $\Delta F_{AL}/F_o$.

В этой же главе 4 представлены корреляции между отношением пропускания листьев T_{Light}/T_{Dark} , способностью восстанавливать в темноте эффективный квантовый выход переноса электронов и уровнем дезоксидации каротиноидов – DE_{Light}/DE_{Dark} (рис. IV.23). Поскольку разброс точек на графиках весьма велик, в подписях к рисункам следовало указать коэффициенты детерминации R^2 , характеризующие качество взятой за основу модели. Аналогичное замечание о слабой корреляции относится к рис. IV.29. Приведенные диаграммы, напоминающие «звездное небо» (рис. IV.29, IV.23a), не столь убедительны, как действие лучей разного спектрального состава (рис. IV.21). Оба луча вызывают сходное снижение активности ФСЦ, но только синий луч вызывает релокацию Хп, что наглядно доказывает отсутствие строгой корреляции между изменениями пропускания листа и активностью ФСЦ.

Этот раздел было бы полезно дополнить сравнением быстрых индукционных кривых флуоресценции (ОИР) в связи с реориентацией Хп при переходах от слабого к яркому свету. Повышение пропускания T после реорганизации расположения пластид в клетке эквивалентно снижению светового потока, поглощаемого хлоропластами. Известно, что низкая интенсивность света замедляет развитие фотохимической стадии – перехода ОI, что можно было показать в явном виде, сравнив индукционные кривые у листьев с разным расположением пластид. В заключении по этому разделу приведены выводы о величине и динамике градиента протонов, но не отмечено, что они основаны на косвенном методе, в котором измеряется флуоресценция Хл, а не ΔpH .

В главе 5 представлены физико-химические, биохимические и морфологические характеристики листьев и целых растений китайской капусты, выращенных при сине-красном светодиодном освещении, а также при

освещении желто-оранжевым светом натриевых ламп высокого давления. Показано, что при равных плотностях потока квантов более продуктивными оказываются растения, выращенные под натриевыми лампами. Предложена математическая модель, которая объясняет высокую продуктивность этой группы растений более глубоким проникновением света, не поглощаемого хлорофиллом. В этом случае достигается более равномерное освещение по толщине листа и в итоге более эффективное использование энергии света. Эти теоретические выводы важны и на практическом плане: для выбора плотности посевов и условий выращивания растений в теплицах и в условиях космических полетов.

Глава 6 посвящена влиянию газового состава среды на состояние ФСА. Показано, что удаление O_2 из газовой фазы резко снижает активности ФСІ и ФСІІ в листьях чайной розы (*Hibiscus*). Эти нарушения вызваны отсутствием O_2 как альтернативного акцептора электронов на уровне ФСІ, а также нарушением темнового окисления пластохинонов и акцептора Q_A . Доля электронов, уходящих от ФСІ на O_2 в нормальных условиях, оценена в 40%. Было бы интересно выяснить, меняется ли это процентное отношение в период освещения и как оно зависит от других лабильных факторов, например, от уровней Ca^{2+} или H^+ в цитоплазме.

Во второй части главы 6 рассмотрено влияние CO_2 и рН на ФСА микроводоросли *Desmodesmus*. Автор подчеркивает аналогию эффектов высокой концентрации CO_2 и понижения рН при добавлении соляной кислоты на Фл Хл. Эта аналогия не должна удивлять: она отражает тесную связь между содержанием разных форм неорганического углерода и величиной рН среды в соответствии с уравнением Гендерсона–Хассельбалха. Было бы уместно отметить в этом разделе, что сдвиг рН смещает равновесие между разными формами уголекислоты, указать значения pK_1 и pK_2 , и использовать эти сведения при интерпретации результатов. Кроме того, в связи с влиянием рН на фотосинтез обычно обсуждают меняющееся соотношение проникающей через

липидные мембраны формы (CO_2) и заряженных непроникающих форм (HCO_3^- , CO_3^{2-}) неорганического углерода. Содержание этих форм определяет доступность CO_2 как субстрата фотосинтеза. Имело смысл пояснить, каким образом клетки получают неорганический углерод в щелочной среде с pH 11 и почему этот pH оптимален для фотосинтеза *Desmodesmus*, несмотря на то, что водоросли обитают в симбиозе с активно дышащими беспозвоночными, где уровень CO_2 должен быть высоким. Графики-вставки на рис. VI.10 создают впечатление, что вертикаль при pH 6.1 служит асимптотой, а значения pH < 6.1 недостижимы. Но совершенно ясно, что при внесении соляной кислоты нижний предел pH не ограничивается значением 6.1. Вероятно, рисунки на вставках можно было представить в иной форме.

В главе 7 наиболее интересен раздел, посвященный влиянию проникающих катионов и антиоксидантов на ФСА. Показано, что проникающие гидрофобные катионы ускоряют выцветание клеток хлореллы, а те же ионы с присоединенным пластохиноном (восстановитель) несколько замедляют ускоренное выцветание. Анализ сигналов ЭПР катион-радикала P680^+ привел к выводу, что проникающие катионы SkQ1 подавляют активность ФСII в связи с инактивацией кислород-выделяющего комплекса. При этом накапливается окисленный пигмент P680^+ , который является сильным тушителем Фл Хл, что и наблюдали в эксперименте. Представленная интерпретация – убедительна.

Но есть и другая неучтенная причина влияния проникающих катионов на Фл Хл. Это – нарушение проводимости мембраны и устранение мембранного потенциала, создаваемого в тилакоидах при действии света. В литературе имеются сведения о том, что отрицательные сдвиги мембранного потенциала вызывают тушение Фл, тогда как повышение положительного потенциала в тилакоидах усиливает Фл. Такое влияние мембранного потенциала связано с тем, перепад энергии между состояниями P^*IQ_A и $\text{P}^+\text{I}^-\text{QA}$ на схеме состояний

ФСА (см. рис. VII.14) существенно зависит от величины мембранного электрического потенциала.

В выводах по главе 7 ионы SkQ предложено использовать в качестве «мягких» ингибиторов ФСП. Неясно только, в чем проявляется «мягкое действие» этих агентов.

В главе 8 рассмотрены ответные реакции ФСА на индуцируемый маннитом плазмолиз, а также на мацерацию клеточной стенки (КС). Предполагается, что процесс мацерации можно рассматривать как удобную модель обезвоживания. Основания для таких предположений не вполне ясны. Известно, что механические свойства КС играют важную роль в поддержании водного баланса. В норме перепад осмотических давлений между цитоплазмой и средой компенсируется наличием механически прочной КС, которая препятствует осмотическому поступлению воды и увеличению клеточного объема, так как способна поддерживать высокое гидростатическое давление внутри клетки. Если прочность КС падает, в клетку будет поступать больше воды (из-за снижения модуля объемной упругости). В этом случае можно ожидать набухания, а не сжатия протопласта. На мой взгляд, ослабление КС под действием гидролитического фермента не может имитировать дефицит влаги; напротив, оно индуцирует большую гидратацию. Весьма вероятно, что одинаковая направленность изменений Фл Хл при плазмолизе и литической деградации КС возникает вследствие разных причин.

В целом, диссертация отражает широкий круг интересов автора: от анатомического описания строения листа и устьиц до расчета сложных молекулярно-динамических моделей. Для успеха работы было необходимо не только освоить методы оптической и ЭПР спектроскопии, но и ориентироваться в анализе экспрессии генов, в электронной микроскопии, хроматографии, определении белков, липидов и отдельных пигментов, а также в других областях. Все это говорит об эрудиции автора в разных областях биофизики и физиологии растительной клетки.

При этом в диссертации встречаются неисправленные опечатки; местами не указаны единицы измерения (табл. VIII.1), имеются отдельные спорные утверждения, частичные повторы при описании растительных объектов. Однако эти мелкие погрешности, а также перечисленные по главам замечания не влияют на высокую оценку диссертации в целом. Замечания носят дискуссионный характер и связаны с интересом к представленной работе, они не ставят под сомнение достоверность полученных результатов и сделанные выводы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в детализации основных механизмов защиты ФСА от избыточного освещения при действии стрессорных факторов различной природы. С практической точки зрения выяснены преимущества дополнительного освещения в области слабого поглощения хлорофилла, что может способствовать выбору оптимальной плотности посева растений, а также повышению их продуктивности при выращивании в теплицах и в условиях космических полетов.

Учитывая актуальность, новизну, объем и высокий научный уровень проведенного исследования, можно заключить, что рассматриваемая диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к диссертациям, представленным на соискание степени доктора наук. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.2. Биофизика и 1.5.21. Физиология и биохимия растений (биол. науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

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

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
профессор кафедры биофизики Биологического факультета
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова»

Булычев Александр Александрович

Контактные данные:

тел.: +7(915)4108961, e-mail: bulychev@biophys.msu.ru

Доктор биологических наук по специальности:

03.01.02. Биофизика

Адрес места работы:

119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр.12

МГУ имени М.В. Ломоносова,

Биологический факультет, кафедра биофизики

Тел.: +7(495)9393503; e-mail: bulychev@biophys.msu.ru

Подпись сотрудника Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

А.А. Булычева удостоверяю:

Ученый секретарь факультета Е.В. Петрова