

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Хао Цзинжао,

«Исследование молекулярных механизмов действия пестицидов на фотосинтетический
аппарат высших растений»,

по специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки)

Актуальность темы исследования. Диссертационная работа Хао Цзинжао посвящена исследованию молекулярных механизмов действия неоникотиноидных инсектицидов (НИ) на фотосинтетическую активность пигментов листьев и субклеточных структур (хлоропласт) растения. Известно, что действие пестицида обусловлено взаимодействием молекулы НИ с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAChR) в нейронах нервной системе насекомых, блокируя ее активность и приводит к гибели насекомого. Важно, что аналогичный эффект НИ могут оказывать на нервную систему человека и животных при попадании в организм с растительной пищей. Действительно, так как современные НИ поглощаются растением через корни или листья, а также диффундируют к листьям по сосудам ксилемы растения, то они могут накапливаться в плодах и листьях растения в течение нескольких недель.

Однако современные представления о механизме действия НИ противоречивы. С одной стороны, обработка НИ повышает всхожесть семян, рост корней, стрессоустойчивость растения (засуха, холод), биомассу, скорость фотосинтеза, а также содержание белка, фиксирующего углекислый газ (CO_2) и устойчивость к заболеваниям. С другой стороны, действие НИ на растение приводит и к негативным эффектам: блокирование фотосинтетических процессов и активности ряда ферментов, снижение прорастания и роста растения, изменение морфологии и стимуляция окислительного стресса растения. Важно, что у растений, обработанных НИ, увеличивается количество биомаркеров окислительного стресса, что свидетельствует об образовании активных форм кислорода (АФК). Очевидно, что увеличение содержания АФК в ходе действия пестицидов вызывает изменение морфологии субклеточных структур, вязкости и других функций клеточных мембран растения.

В связи с этим исследование, проведенное Хао Цзинжао «Исследование молекулярных механизмов действия пестицидов на фотосинтетический аппарат высших растений», цель которого сформулирована как «изучение молекулярных механизмов воздействия неоникотиноидных инсектицидов (ТМХ, и его производного, КЛ) на

молекулярную структуру и функции фотосинтетических пигментов различных генотипов кукурузы (инбредной линии кукурузы zppl 225 и гибридной линии zp 341)» является, безусловно, актуальным, а полученные диссертантом данные имеют как фундаментальное, так и прикладное значение.

Структура диссертационной работы. Диссертационная работа Хао Цзинжао построена по классическому образцу и состоит из разделов, включающих «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», а также содержит разделы «Заклучение», «Выводы» и «Список литературы», включающий 213 ссылок. Работа иллюстрирована 71 рисунком, а также содержит 29 таблиц. Текст диссертационной работы изложен на 172 страницах.

Во «**Введении**» Хао Цзинжао описана актуальность исследования, сформулированы цель и задачи работы, положения, выносимые на защиту, научная новизна, а также теоретическая и практическая значимость работы, приведены данные о методологии и методах исследования, апробации результатов и данные о публикациях (6 статей в рецензируемых научных изданиях).

В «Обзоре литературы» диссертационной работы Хао Цзинжао представлен анализ современных представлений о строении и функциях пигментов листа (хлорофилл, каротиноиды) и результаты, характеризующие действие пестицидов на растения, а также современных методов исследования (КР- и ИК- спектроскопия, переменная флуоресценция, JIP-тест, SERS и математическое моделирование) и разнообразный набор объектов (различные генетические типы растений, субклеточные фракции, выделенные молекулы) для проведения работы по теме диссертации.

Раздел «**Материалы и методы**» содержит описание объектов (различные генотипы кукурузы (инбредная линия кукурузы zppl 225 и гибридной линии zp 341, лист, семена), хлоропласты гороха, методов исследования, процедуры приготовления препаратов и обработки полученных данных. Автор подробно описывает использованные в работе методы, среди которых, на мой взгляд, важным было регистрация изменений содержания и конформации молекул каротиноидов с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) как от листовой пластинки кукурузы, так и выделенных субклеточных структур – хлоропластов. Интерес вызывают исследования с помощью измерения флуоресценции хлорофилла на целых листьях с использованием многофункционального анализатора (M-PEA-2) для регистрации кинетики быстрой флуоресценции и модулированного отражения/поглощения света, а для анализа OJIP-кривых, Хао Цзинжао использовала JIP-тест со следующими

параметрами: интенсивность на 20 мкс (F_0), 2 мс (F_I), 30 мс (F_I), F_M (максимальный уровень флуоресценции). Кинетику индукции флуоресценции (кривые OJIP) автор регистрировал с помощью анализатора (PEA). Флуоресценция хлорофилла стимулировалась светом ($\lambda = 650$ нм) интенсивностью 1500 мкмоль фотонов $m^{-2}s^{-1}$, а кинетику темнового затухания флуоресценции хлорофилла и замедленной флуоресценции (ЗФ) регистрировали с помощью прибора ФКМС-2 (МГУ им. М.В. Ломоносова, РФ). Отмечу, что для сопоставления физических параметров и функции листа или клеток Хао Цзинжао регистрировала скорость выделения и поглощения O_2 с помощью метода амперометрии и электрода Кларка

На мой взгляд, одним из достижений работы является исследования как морфологии и рельефа поверхности хлоропластов при действии пестицидов с помощью метод атомно-силовой микроскопии. Измерения проводились в полуконтактном режиме с использованием кантилевера NSG 10-A, средний коэффициент упругости которых составлял $11,8$ Н/м, а радиус кривизны наконечника - 10 нм и позволило выявить новые изменения как морфологии, так и рельефа поверхности хлоропласта при действии пестицида. При этом Хао Цзинжао исследовала изменения вязкости мембран хлоропластов (упаковка жирнокислотных «хвостов» фосфолипидов) с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В качестве спин-зонда использовали 16-доксилстеариновую кислоту, аналог спин-меченой стеариновой кислоты, а спектры ЭПР регистрировали с помощью спектрометра ЭПР РЭ 1308 (РФ) при $23-24^\circ C$ и напряженности магнитного поля, СВЧ-мощности и постоянной времени: 3338 Гс, 22 мВт и $0,1$ с, соответственно.

В целом этот раздел совместно с разделом, где представлены полученные автором разнообразный дизайн исследования и экспериментальные данные, демонстрирует высокий уровень квалификации Хао Цзинжао в области биофизики и фотобиологии.

Раздел «**Результаты и обсуждение**» представляет наибольший интерес, поскольку в нем представлены основные достижения рецензируемой работы Хао Цзинжао. В данной работе представлены результаты исследования, проведенного на листьях двух различных генотипов кукурузы (zrpl 225 и zr 341) после воздействия пестицидом (ТМХ, внешнее опрыскивания листа или при внесении в почву за счет прикорневого полива растения) и на хлоропласты (КЛ). Таким образом, автор исследовал действие пестицида на лист в зависимости от его проникновения – прямого, или опосредовано, через корневую систему растения. Установлено, что при действии ТМХ непосредственно на лист такой параметр активности хлоропластов как PI_{ABS} и

содержание хлорофилла существенно уменьшается (особенно для zprl 225), что, вероятно, свидетельствует о снижении синтеза хлорофилла и увеличения синтеза антиоксидантов - каротиноидов (антиоксидантная защита). Анализ кинетики ЗФ, при опрыскивании листьев ТМХ, свидетельствует об уменьшении образования окисленных и увеличении - восстановленных форм акцепторов ФСІ (P700) только у zprl 225. Вероятно, это связано с уменьшением пула акцепторов, таких как P700, на акцепторной стороне ФСІ, что не происходит РЦ ФСІ листьев гибрида zр 341.

Очевидно, что в ходе длительного пребывания в растении молекулы ТМХ разрушаются и логично, было исследовать влияния производного ТМХ, КЛ не только на функционирование фотосинтетических процессов, но и на структуру, а также вязкость мембраны хлоропласта, внутриклеточных структур клеток листа. Установлено, что в хлоропластах, обработанных КЛ, уменьшается поток электронов, что сопровождается снижением выделения O_2 (Табл. 1). По мнению автора, это происходит за счет уменьшения числа РЦ, способных к реокислению Q_A , а также увеличения доли РЦ с незаполненным сайтом связывания Q_B (Рис. 6, табл. 4). Вероятно, КЛ способен связываться с гидрофобными и/или полярными аминокислотами в сайте Q_B белка D_1 , конкурируя за сайт связывания с пластохиноном.

Я считаю важным результатом работы работа Хао Цзинжао тот факт, что при действии пестицида выявлены изменения морфология и вязкости мембраны хлоропластов, что модифицирует Q_B и переноса электронов между Q_A и Q_B , инициируя генерацию триплетного состояния хлорофилла что, коррелирует с увеличением количества маркеров окислительного стресса и активных форм кислорода (АФК).

Диссертационная работа Хао Цзинжао представляет собой тщательно спланированное, комплексное исследование, свидетельствующее о высокой квалификации автора. Невзирая на высокую оценку этой работы к автору есть ряд вопросов и замечаний:

1. В работе, с помощью атомно-силовой микроскопии установлено, что в норме, хлоропласты имеют дисковидную форму, а рельеф поверхности мембраны определяется глобулярными структурами хлоропластов. Почему не использовали метод электронной микроскопии?
2. Есть ли корреляция между изменениями поглощения кислорода и увеличения количества АФК при действии пестицида на хлоропласты растения?
3. К сожалению, в работе встречаются некоторые опечатки, которые приводят к получению читателем неверной информации.

В заключении необходимо отметить, что диссертационная работа Хао Цзинжао соответствует специальности 1.5.2. «Биофизика», а именно следующим ее направлениям: биофизика клетки. Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М. В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.2. «Биофизика» (по биологическим наукам), 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 кандидата наук Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Хао Цзинжао заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. «Биофизика».

Официальный оппонент:

Доктор физико-математических наук,
профессор кафедры физики полимеров и кристаллов отделения физики твердого тела
физического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Яминский Игорь Владимирович

30 марта 2025 года

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 939-1009, e-mail: yam._____

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 01.04.19 –
физика полимеров

Адрес места работы:

119991 Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 2,
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,
физический факультет, кафедра физики полимеров и кристаллов, отделение физики
твердого тела, кафедра физики полимеров и кристаллов
Тел.: +7 (495) 939-1009; e-mail: yaminsky@nanoscopy.ru

Подпись профессора физического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова» Яминского И.В. удостоверяю:

Ученый секретарь У
Московского госуда

Ломоносова,

д.ф.-м.н., профессор

С.Ю. Стремоухов