ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Кондаковой Марины Александровны «Влияние гипотермии на состав и активность суперкомплексов системы окислительного фосфорилирования митохондрий проростков гороха *Pisum sativum* L.», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений

Диссертационная работа М.А. Кондаковой посвящена изучению надмолекулярной организации системы окислительного фосфорилирования митохондрий растений. В последнее десятилетие появляется все больше сведений о том, что дыхательные ферменты и АТФ-синтаза организованы в сложные динамичные структуры – суперкомплексы и мегакомплексы, что, как предполагается, способствует более эффективному и стабильному функционированию электрон-транспортной цепи митохондрий (Рахманкулова, 2014; Dudkina et al., 2014). Однако этой информации по-прежнему крайне мало и часто она носит противоречивый характер. Многие вопросы остаются слабо изученными, в частности имеются лишь единичные сведения о влиянии факторов среды на состав и активность суперкомплексов. Влияние же гипотермии на состав, содержание и активность суперкомплексов окислительного фосфорилирования в растительных митохондриях практически не исследовано. Исходя из вышеизложенного, актуальность работы М.А. Кондаковой, направленной на изучение надмолекулярной организации системы окислительного фосфорилирования митохондрий этиолированных проростков гороха в нормальных условиях и при гипотермии, не вызывает сомнений.

Диссертация изложена на 167 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 16 рисунками, содержит 6 таблиц и 6 приложений. Список литературы включает 236 источника, из них 197 на иностранных языках.

Во введении отражена актуальность, четко обоснованы и сформулированы цель и задачи работы, ее новизна и практическая значимость.

В разделе «Обзор литературы» подробно описаны компоненты системы окислительного фосфорилирования митохондрий растений, большое внимание уделено современным представлениям о ее надмолекулярной организации и функциональной роли суперкомплексов, представлены имеющиеся в настоящее время сведения о влиянии факторов среды на содержание и активность суперкомплексов. Несомненным достоинством обзора литературы является то, что он завершается заключением, в котором обоснована цель диссертационной работы.

В главе 2 представлена детальная информация об объекте, методах исследований и статистической обработке полученных данных. Работу отличает использование широкого

спектра современных методов исследований (голубого нативного электрофореза, электронной микроскопии, иммуно-блоттинга, масс-спектрофотометрии), адекватных поставленным задачам. Особо следует подчеркнуть, что автором использованы свежевыделенные из этиолированных проростков митохондрии с высокой степенью чистоты и интактности, мягкий неионный детергент дигитонин, а также щадящие условия нативного голубого электрофореза. Все это позволило автору успешно решать поставленные задачи.

В Главе 3 представлены полученные в ходе исследований результаты, большинство их которых являются приоритетными. Автором впервые продемонстрировано, что система окислительного фосфорилирования митохондрий этиолированных проростков гороха имеет более сложную надмолекулярную организацию, чем считалось ранее на основании результатов исследований Taylor et al. (2005). Автором не только подтверждено наличие у гороха характерных и для других видов растений респирасом $I+III_2+IV_n$, но и впервые обнаружены суперкомплекс $NDA+NDB+III_2+IV$, мажорная респирасома $I+NDA+III_2+IV$, мегакомплекс $(II+III_2+IV)_n$ и две АТФ-синтасомы. Кроме того, впервые показано, что основная часть внутренних и внешних альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ связаны с суперкомплексами, а альтернативная оксидаза в основном находится свободной, несвязанной форме. Обнаруженная ассоциация альтернативных ферментов с суперкомплексами, по мнению автора, может способствовать увеличению адаптационных возможностей митохондрий.

Особого внимания заслуживают результаты изучения состава, содержания и активности суперкомплексов и отдельных комплексов системы окислительного фосфорилирования митохондрий этиолированных проростков гороха при низкотемпературных воздействиях – закаливании (7°C, 7 сут), «мягком стрессе» (2°C, 7 сут) и «жестком стрессе» (-7°C, 1.5 ч). Автором впервые установлено, что при всех указанных типах низкотемпературных воздействий происходит снижение содержания и активности суперкомплексов $I+III_2+IV_n$, $I+NDA+III_2+IV$, $Va+NDA+NDB+AOX$ и $Vb+NDA+NDB+AOX$, что, по его мнению, вызвано распадом этих структур, связанным с развитием процессов перекисного окисления липидов. Кроме того, автором впервые показано, что как при мягких, так и жестких стрессовых условиях распад суперкомплексов приводит к накоплению и повышению активности комплексов I и III_2 и небольшого суперкомплекса III_2+IV, что может усиливать генерацию АФК в митохондриях, снижение их функциональной активности и целостности. Интересно отметить, что в условиях жесткого стресса увеличение активности и содержания комплекса I оказалось наиболее высоким, что свидетельствует об активном выходе

НАДН-убихинон-оксидоредуктазы из суперкомплексов. Сопоставление результатов исследований с данными других авторов, изучавшими суперкомплексы у растений в условиях гипоксии и низком pH, позволило М.А. Кондаковой предположить, что частичная потеря суперкомплексной организации является общей реакцией системы окислительного фосфорилирования митохондрий на изменение условий среды у различных видов растений.

Интересны полученные автором данные о том, что в условиях холодового закаливания (7°С) распад суперкомплексов сопровождается сохранением активности комплекса I на уровне контроля, что приводит к разобщению процессов окисления и фосфорилирования, снижает генерацию АФК и сохраняет целостность мембран митохондрий.

Завершают работу 7 выводов, которые вытекают из результатов проведенных исследований и соответствуют поставленной цели и задачам работы.

Таким образом, полученные в работе новые данные об изменении строения системы окислительного фосфорилирования митохондрий проростков гороха при низкотемпературных воздействиях представляют большой научный интерес и будут способствовать дальнейшему развитию исследований в этом направлении.

Несомненным достоинством диссертационной работы является то, что она основана на результататах хорошо продуманного и организованного исследования. Актуальность, научная новизна работы и ее практическая значимость не вызывают сомнений. Достоверность полученных результатов и сделанных выводов подтверждена результатами статистической обработки. Научные положения, сформулированные в работе, четко обоснованы. Работа логично построена, хорошо изложена и иллюстрирована. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации.

По результатам исследований диссертантом опубликовано 11 работ, в том числе 4 статьи из Перечня ВАК РФ. Очевидно, что полученные данные достойны публикации в журналах с более высоким рейтингом.

В целом, диссертация оставляет благоприятное впечатление, хотя необходимо отметить некоторые недостатки работы и вопросы, возникающие при ее прочтении.

1) В диссертации нечетко обоснован выбор температурных воздействий и их продолжительности. В частности, если по выживаемости растения в 4 вариантах опыта четко различаются, то по другим показателям, характеризующим их реакцию на гипотермию, различия не столь очевидны. Не понятно также, почему тестирующее воздействие (-7°С в течение 1,5 ч) совпадает с одним их вариантов низкотемпературного воздействия («жесткий стресс»).

2) Работа выполнена на этиолированных проростках гороха, можно ли полученные данные экстраполировать на зеленые растения?

3) На «Схеме организации OXPHOS митохондрий гороха в оптимальных и низкотемпературных условиях» (рис. 16) в варианте «Стресс» объединены изменения дыхательных комплексов у гороха при действии низкой положительной (2°C) и отрицательной (-7°C) температур, хотя автором обнаружены различия в реакции на мягкий и жесткий стресс (табл. 6). Считает ли автор эти различия несущественными?

4) В работе встречаются почти дословные повторы текста, например стр. 9 и 28 (По мере накопления данных…), стр. 9 и 29 (Согласно последней…).

Однако высказанные замечания не влияют на высокую оценку представленной диссертационной работы.

Все вышеизложенное позволяет сделать заключение о том, что диссертация М.А Кондаковой представляет собой завершенную научную работу, результаты которой вносят важный вклад в развитие представлений об организации и функционировании системы окислительного фосфорилирования в митохондриях растений как в нормальных условиях, так и при гипотермии.

Таким образом, диссертационная работа М.А. Кондаковой «Влияние гипотермии на состав и активность суперкомплексов системы окислительного фосфорилирования митохондрий проростков гороха *Pisum sativum* L.» соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым ВАК Минобразования и науки РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений».

Таланова Вера Викторовна
Главный научный сотрудник лаборатории экологической физиологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Карельского научного центра РАН (ИБ КарНЦ РАН),
доктор биологических наук 03.00.04 – биохимия, 03.00.12 – физиология и биохимия растений
185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11,
тел.(8142)762712, e-mail: talanova@krc.karelia.ru

Подпись В.В. Талановой удостоверяю
Ученый секретарь ИБ КарНЦ РАН, к.б.н. Е.М. Матвеева

4.05.2017