

**ОТЗЫВ официального оппонента**  
**на диссертацию на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук Клементьева Константина Евгеньевича**  
**на тему: «Влияние высокоэнергетических частиц на первичные**  
**процессы преобразования энергии в фотосинтетическом аппарате**  
**цианобактерий»**  
**по специальности 03.01.02 – «Биофизика»**

Известно, что вне ионосферы земли солнечная и космическая радиация, которая представляет из себя различные виды микрочастиц и электромагнитных полей, способна ионизировать вещество той или иной среды и представляет большую опасность для биологических объектов.

Учитывая, что человечеству предстоит в ближайшем будущем освоение космоса, знание механизмов защиты биологических объектов от такого излучения является актуальной задачей. Наиболее устойчивы к ионизирующему излучению (ИИ) микроорганизмы, в частности цианобактерии. При этом использование для изучения путей защиты от ИИ цианобактерий, которые являются наиболее древними кислородными организмами и выработали в течение длительной эволюции определенные механизмы защиты от ИИ представляется целесообразным. Высокая устойчивость цианобактерий к природным факторам позволяет им доминировать в экстремальных местообитаниях и первыми заселять пространство после различных катаклизмов. Кроме того, цианобактерии, имеющие разные фикобилины, способны к хроматической адаптации и могут синтезировать различные пигменты в ответ на изменение спектрального состава света

На основании изложенного считаю, что представленная тема диссертационной работы несомненно является актуальной как с точки зрения биофизики, так и биологии в целом.

Цель работы заключалась в изучении влияния ионизирующего излучения (ИИ) высокоэнергетических частиц на первичные процессы преобразования энергии в фотосинтетическом аппарате цианобактерий. При этом диссертант предположил, что наличие у цианобактерий фикобилисом могло играть специфическую роль не только в фотозащите, но и в радиопротекции, что могло играть важную роль на ранней стадии развития жизни на Земле.

Во введении рассматриваются определенные преимущества цианобактерий перед другими биологическими объектами. Однако целесообразно было бы более подробно описать преимущества и особенности организации цианобактерий по сравнению с другими фототрофами. Так, цианобактерии могут осуществлять аноксигенный фотосинтез с помощью только ФС1 и работает при этом циклическое фотофосфорилирование, а также способны к хроматической адаптации меняя пигментный состав. Хорошо бы также немного характеризовать именно во введении оранжевый каротиноидный белок (ОСР), который служит белком-тушителем, уменьшающим на интенсивном свете передачу энергии от фикобилисом к хлорофиллу в пигментном аппарате фотосинтеза у цианобактерий.

Диссертант показал, что как ИИ во время космического полета, так и облучение  $\alpha$ -частицами с энергией около 30 МэВ, которое моделирует воздействие тяжелыми ядрами частиц высоких энергий, которые могут входить в состав космических лучей, вносит существенный вклад в нарушение первичных процессов трансформации энергии в фотосинтетическом аппарате клеток цианобактерий *Synechocystis sp.* Показана важность антенного комплекса фикобилисом, в частности его размера, в выживании клеток цианобактерий. Показано, что образование красной формы белка ОСР которая играет защитную роль при действии стрессовых факторов может происходить под воздействием АФК. Обнаружена способность клеток цианобактерий и восстановлению нормального функционирования фотосинтетического аппарата и фотоавтотрофного роста после действия высоких доз ИИ и

факторов космического полета. Эти результаты, полученные диссертантом, несомненно содержат элемент научной новизны.

В обзоре литературы анализируется строение и функционирование фотосинтетического аппарата цианобактерий, рассматриваются различные защитные механизмы и пути адаптации к стрессовым условиям. Анализируются мишени воздействия различных видов ионизирующего излучения на фототрофные организмы, а также способы защиты, выработанные в процессе эволюции. Также рассмотрены наиболее значимые эксперименты, проведенные в космосе, и способы моделирования стрессовых воздействий на биологические объекты в процессе экспериментов в космосе.

В результате литературного обзора исследуемой проблемы автор приводит оценку научных задач, которые дали необходимый базис для развития и подтверждения защищаемых автором развиваемых гипотез и основных защищаемых положений.

Во второй главе детально описываются объекты и методы исследований. Описываются методы оценки состояния ФА и методики, связанные с использованием источников ИИ способами оценки этого излучения. Подробно характеризуются источники излучения. Описан 120-см циклотрон НИИЯФ МГУ, позволяющий получать ускоренные ядра гелия. Он был использован для моделирования ионизирующего космического излучения. Детально описана программа Фотон-М №4, каким образом проводились эксперименты на культуре цианобактерий находящихся в спутнике, а также процесс восстановления активности суспензии после возвращения на землю.

Отметим, что диссертантом использованы самые современные методы исследования, которые включают метод переменной флуоресценции Хл а, спектрофлуориметрию высоковременного разрешения, также представлены данные полученные с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Важно отметить многосторонний подход автора с использованием различных подходов. Так, опыты проводили с использованием 120-см циклотрона НИИЯФ МГУ, позволяющего получать

ускоренные ядра гелия, что позволило моделировать космическое ИИ. Эксперименты с культурой *Synechocystis sp.* PCC 6803 проводили не только на земле, но и в космосе, на спутнике Фотон-М №4. Такой экспериментальный подход позволил сделать достаточно широкое обобщение полученных результатов. Однако, возможно было бы целесообразно несколько сузить эту главу и несколько расширить введение для лучшего понимания сути экспериментов широкому кругу читателей.

В 3-ей главе описаны результаты и представлено их обсуждение.

Глава состоит из 6 частей. В главе рассматриваются изменение содержания фотосинтетических пигментов, данные по миграции энергии между антенным комплексом и реакционным центром в клетках цианобактерий после облучения и пребывания цианобактерий в космосе, а также дается оценка состояния фотосистемы. Кроме того, представлены данные по влиянию ИИ на свойства выделенных фикобилипротеинов по влиянию влияния активных форм кислорода, генерируемых фотосенсибилизатором, на состояние оранжевого каротиноидного белка ОСР и результаты оценки жизнеспособности цианобактерий после космического полета и действия ИИ.

При этом ИИ моделируется облучением клеток  $\alpha$ -частицами с энергией около 30 МэВ, которое моделирует воздействие тяжелыми ядрами частиц высоких энергий, которые могут входят в состав космических лучей. При этом важнейшим результатом является доказательство существенной роли фикобилисом в выживании клеток цианобактерий в вышеприведенных условиях. Также интересен обнаруженный диссертантом факт образования активной формы ОСР под влиянием активных форм кислорода, генерируемых фотосенсибилизатором. Возможно это является проявлением эффекта гормезиса, когда при не очень высоких уровнях АФК активируются стресс-защитные механизмы у различных организмов.

Иллюстрации в главе и других главах представлены отличным образом. Их достаточно много (73 рисунка и 10 таблиц) и они в основном цветные.

**Считаю, что научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации Клементьева Константина Евгеньевича обоснованы, достоверность данных и научная новизна не вызывают сомнений.**

Это подкрепляется не только данными диссертации, но и списком научных статей с участием диссертанта. Это 10 научных статей в журналах с высоким импакт-фактором (2.3-4.4).

#### **Основные замечания**

1. Насколько обосновано сравнение действия ИИ в космосе и на земле с использованием альфа-частиц. Даже при одинаковой энергии возможно несколько разное действие ИИ разной природы. Насколько  $\alpha$ -частицы с дозой 120 кГр соответствуют по воздействию ИИ при полете Фотона М-4. С другой стороны, видимо, для начала исследований такой подход обоснован.

2. В последнем основном защищаемом положении написано; «Образующиеся под действием ИИ активные формы кислорода (АФК) могут активировать ОСР и соответствующие фотозащитные механизмы для предотвращения повреждения ФБС». Однако в выводах не совсем четко сказано о фотозащитных механизмах, связанных с ФБС и ОСР.

3. Насчет генерации АФК фталоцианинами алюминия при исследовании влияния АФК на оранжевый каротиноидный белок. В основном фталоцианины генерируют синглетный кислород. Тогда что можно сказать об АФК генерируемых при действии ИИ в космосе и на циклотроне. Насколько сопоставимы данные. Насколько отличаются АФК генерируемые в модели с использованием фталоцианинов алюминия и ИИ, используемого в исследовании диссертанта.

#### **Минорные замечания**

В пункте 4 научной новизны написано: «Показано, что АФК могут активировать фотозащитные реакции в фотосинтетическом аппарате цианобактерий». Надо бы уточнить, то есть дописать как именно, например, путем образования красной формы оранжевого каротиноидного белка.

**Вывод 2.** При этом происходит двукратное увеличение времени жизни флуоресценции ФБС, свидетельствует об отсоединении антенных комплексов от фотосистем. Пропущено слово что.

**Вывод 3.** Написано: «Отсоединение фикобилиновой антенны при действии ИИ приводит к снижению фотосинтетической активности ФС2, что видно по изменениям формы кривых индукции флуоресценции...». Лучше написать: «...что видно по снижению максимального квантового фотохимического выхода  $F_v/F_m$ ».

В подписи к рис. 11. написано «Обесцвечивание каротиноида ОСР при фотоиндуцированной генерации АФК фталоцианином алюминия (АлФЦ)». Откуда известно, что происходит обесцвечивание именно каротиноида?.

В третьем защищаемом положении говорится об ОСР, но нет расшифровки термина, которая появляется далее в тексте.

В научной новизне даны 4 вывода, которые несомненно являются новыми. Однако вывод 4: «Показано, что АФК могут активировать фотозащитные реакции в фотосинтетическом аппарате цианобактерий» следовало бы дополнить расшифровав, каким образом реализуется фотозащитная реакция, как это, например, дано в выводе 6 автореферата.

**В тексте встречается ряд вульгаризмов.** Так, в заключении написано:

1. «При этом ОСР под действием света переходит в активное красное состояние,....».
2. «АФК, в свою очередь, могут переводить ОСР в красную форму, которая, вероятно, является активной и тушит ФБС». Тушит фикобилисому???

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 паспорту специальности 03.01.02 – «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 приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Клементьев Константин Евгеньевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук  
ведущий научный сотрудник  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук» (ФГБУН ИФПБ РАН)

Креславский Владимир Данилович

Контактные данные:

тел.: 8(4967)73-29-88, e-mail: [REDACTED]

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Адрес места работы:

142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская д.2,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук» (ФГБУН ИФПБ РАН)

Тел.: 8(4967)73-29-88; e-mail: [REDACTED]

Подпись сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук» (ФГБУН ИФПБ РАН) В.Д. Креславского удостоверяю:

18. 11. 2019

