МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ
им. К.А. Тимирязева
Российской академии наук
127276, Москва, Ботаническая ул., 35
Тел. (499) 678-54-00, Факс (499) 678-54-20
E-mail: ifr@ippras.ru

от 29.10.2026 № 293/26

На №_____ от_____

УТВЕРЖДАЮ
Директор
Института физиологии растений
им. К.А. Тимирязева РАН
чл.-корр. РАН Лось Д.А.

«29» октября 2026 г

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Обухова Юрия Николаевича
«Исследование фотохимических свойств водорастворимых хлорофилл-связывающих белков семейства WSCP-II»,
представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы исследования. Диссертационная работа Юрия Николаевича Обухова посвящена изучению фотохимических и фотофизических свойств водорастворимых хлорофилл-связывающих белков семейства WSCP (Water-Soluble Chlorophyll-binding Protein) класса II, обнаруженных у ряда семейств цветковых растений (Brassicaceae и ряд других). Особенность данной группы белков состоит в том, что они, в отличие от широко известных хлорофилл-связывающих белков фотосинтетического аппарата, не ассоциированы с липидными структурами и не участвуют в процессе фотосинтеза. Объектом изучения были холобелки WSCP класса II, чьи фотохимические свойства ранее не были исследованы. Холоформы этих белков представляют собой водорастворимые гомотетрамеры (MW ≈ 80 кДа), в состав которых входят четыре молекулы хлорофилла, упакованные в виде димеров. По ряду признаков структура этих димеров сходна со структурой «специальной пары» в реакционных центрах фотосистем. Остаётся неясным, для какой функциональной роли в растениях необходима о такая структурная организация, но известно, что данная функция непосредственно не связана с процессом фотосинтеза и, по-видимому, ассоциирована с процессом адаптации растений к различным видам стрессовых условий.

Основной целью автора диссертационной работы были о определение ить и проанализ ировать способности димеров хлорофилла в холобелках WSCP-II к проявлению фотохимической активности. Достижение данной цели актуально и необходимо для прояснения возможных функций этих пигмент-белковых комплексов в растениях, и важно для оценки перспектив их практического применения в биотехнологии.

Новизна и научно-практическая ценность работы. В рамках работы впервые комплексно исследованы фотохимические свойства пигмент-белковых комплексов WSCP класса II. Автору удалось получить свидетельство наиболее ранней фотохимической активности холобелков WSCP: с помощью метода «возбуждение-зондирование» фемтосекундной лазерной спектроскопии показано, что при фотовозбуждении связанного холобелками хлорофилла с переводом молекул в состояние S_3 происходит потеря энергии возбуждения, свидетельствующая о фотохимическом взаимодействии хлорофилла со своим аминокислотным микроокружением. Кроме того, в диссертации продемонстрирована фотосенсибилизация комплексами WSCP класса II окислительно-восстановительных реакций с участием нескольких видов активных форм кислорода – синглетного кислорода и супероксидного анион-радикала. В плане оценки функциональной роли данных белков важны данные о том, что скорость окисления холобелками WSCP класса II органических молекул сравнима со скоростью окисления хлорофиллом, не связанным с белком. Полученные данные важны для оценки доминирующей ныне в литературе гипотезы о фотозащитной функции холобелков WSCP класса II в растениях.

Практическая значимость результатов работы Обухова Ю.Н. состоит в том, что выявление фотохимической активности данных белков перспективно для биотехнологических разработок, из которых наиболее перспективным представляется создание средств фотодинамической терапии.

Структура работы. Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из Оглавления, Списка сокращений, Введения, четырёх основных разделов («Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты» и «Обсуждение»), Заключения, Выводов, Списка цитированной литературы и Благодарностей. Раздел «Результаты» состоит из четырёх подразделов, соответствующих классификации полученных результатов. Диссертационная работа изложена на 126 страницах, содержит 36 рисунков, одну таблицу и 161 источник литературы.

В работе поставлены четыре задачи, согласно которым сформулированы четыре положения, выносимые на защиту. Положения автора представляются достоверными и обоснованными. По результатам диссертации сформулированы заключение и пять выводов, которые соответствуют поставленным задачам и целям. Выводы, которые Ю.Н. Обухов даёт на

основании совокупности данных, представленных в работе, полностью убедительны.

Оценка содержания работы и её завершённости. Во Введении автор обосновывает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи, определяет научную новизну и научно-практическую значимость работы.

Раздел «Обзор литературы» начинается с описания водорастворимых хлорофилл-белковых комплексов различных групп фотосинтетических организмов. Рассматриваются известные механизмы теплового рассеяния избыточной поглощенной энергии света, защищающие пигмент-белковые комплексы от фотогенерации АФК. Далее обзор фокусируется непосредственно на белках WSCP, истории их обнаружения, исследования и разделения на два неродственных класса – I и II. Рассмотрен механизм фотохимических преобразований пигмента в холобелках WSCP класса I, а также известные сведения об их фотохимической активности. Описана также структура и возможная функциональная роль холобелков WSCP класса II. Автор показывает, почему представленные в литературе сведения и предположения функциях холобелков WSCP класса II противоречивы и не дают в полной мере понимания о возможности этих холобелков участвовать в фотохимических реакциях.

В разделе «Материалы и методы» автор приводит описание методических подходов, использованных в работе. Большой объем этой части диссертации определяется подробным описанием методов, которое в некоторых подразделах приобретает несколько избыточный характер. Работа проведена с использованием современных молекулярно-биологических, биохимических и спектроскопических методов, включая требующий уникального оборудования метод фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» (эта часть исследования проводилась совместно с ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН в рамках проекта РНФ). Работа проведена с использованием рекомбинантных апобелков, полученных в системе экспрессии плазмидных векторов в *Escherichia coli* и затем переведённых в холоформу путём инкубации с источником хлорофилла. Основной метод очистки полученных комплексов WSCP (апопротеин-хлорофилл), использованный в работе — металл-аффинная хроматография, причем автор работы добавил к ранее известной методике дополнительную стадию предварительной очистки с помощью мягкого нагревания и окончательной стадию получения центрифужных белковых концентраторов. Димерная укладка хромофорных групп в холобелках была подтверждена методом измерения кругового дихроизма в видимой области спектра. Пигментный состав хлорофилл-связывающих белков определён с помощью анализа спектров поглощения данных комплексов. Абсорбционную динамику возбужденных состояний хлорофилла в WSCP исследовали метод фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование». Способность холобелков WSCP фотосенсибилизировать окислительно-

восстановительные реакции реагентов в растворе определялась с помощью абсорбционной спектрофотометрии.

В разделе «Результаты» описаны и проанализированы полученные результаты исследования. Изложение материала состоит из четырёх частей, соответствующих основным направлениям проведенной работы.

Первая часть раздела посвящена обоснованию причин, по которым в качестве объектов были выбраны два холобелка – BoWSCP и LvWSCP – а не один, и содержит в себе выводы из сделанного автором биоинформатического исследования. Сами материалы биоинформатического исследования в работе подробно не рассматриваются, так как полученные результаты совпали с данными, изложенными в параллельно проведенном независимом поиске Prabahar et al. (2020).

Во второй части раздела Ю.Н. Обухов описывает процесс получения и оценки нативности холобелков BoWSCP и LvWSCP. Результаты денатурирующего электрофореза в ПААГ продемонстрировали не только соответствие молекулярной массы белка нативным значениям и чистоту полученных препаратов, но и правомочность использования мягкого прогрева препарата в качестве метода его предварительной очистки. Приведённые спектры поглощения, флуоресценции и кругового дихроизма в видимой области аналогичны спектрам, опубликованным в литературе и подтверждают нативность препарата. Автором предложен новый способ определения пигментного состава холобелков BoWSCP и LvWSCP, основанный на математическом расчёте соотношения амплитуд пиков поглощения в красной и сине-зеленой областях спектра поглощения. Суммарно, продемонстрированные результаты свидетельствовали, что полученные холобелки не имели значимых отличий от нативных холобелков и могли быть использованы для экспериментов.

В третьей части раздела Результаты (1-я глава) описаны данные исследования хромофорных групп холобелка BoWSCP методом фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование». Результаты демонстрируют потерю энергии возбуждения молекулами хлорофилла во время конверсии возбужденного состояния S_3 в S_1. Эту потерю автор интерпретирует как свидетельство протекания сверхбыстрой фотохимической реакции хлорофилла с аминокислотным микроокружением.

Во второй главе третьего подраздела описаны результаты исследования способности холобелков WSCP класса II фотоиндуцировать окислительно-восстановительные реакции в растворе. Показана способность холобелков сенсибилизировать окисление молекул, опосредованное генерацией синглетного кислорода, а также способность индуцировать фотовосстановление цитохрома *c*, опосредованное генерацией супероксидного анион-радикала.

В четвертой, заключительной, части раздела рассмотрена устойчивость холобелков WSCP класса II к свету и участию в фотохимических реакциях в качестве фотосенсибилизатора. В дополнение к этому автор работы продемонстрировал высокую устойчивость спектров поглощения холобелков WSCP класса II как к повышению температуры до 70°C, так и к варьированию pH раствора от кислых до щелочных значений (от 3 до 11).

В разделе «Обсуждение» автор диссертации анализирует полученные результаты в сопоставлении друг с другом, и на этой основе пытается сформулировать возможную физиологическую роль холобелков WSCP класса II в растениях. Дополнительно в данный раздел помещен материал, который, скорее, должен присутствовать в разделе «Результаты» — о сравнении фотоокислительной активности молекул хлорофилла внутри холобелков WSCP с активностью несвязанного хлорофилла в мицеллах детергента. Исходя из совокупности полученных результатов, автор ставит под сомнение выполнение холобелками WSCP класса II фотозащитных функций в растениях. Согласно полученным результатам, данные холобелки могут являться устойчивыми фотогенераторами активных форм кислорода, в защитных механизмах ряда семейств цветковых растений от атак патогенных организмов.

В разделе «Заключение» обобщены результаты работы и подчеркнуты возможные направления их научного и практического использования. Выводы, сформулированные в диссертации, соответствуют поставленным задачам, вытекают из результатов работы и являются в полной мере обоснованными. Представленное в диссертационной работе описание экспериментов свидетельствуют, что поставленные задачи были решены успешно. Тема диссертации, её положения и выводы полностью соответствуют специальности 1.5.4. Биохимия.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации. Автореферат диссертации оформлен по стандартной форме и соответствует установленным требованиям. Автореферат полностью отражает содержание диссертации и дает представление о степени участия и самостоятельности автора в исследованиях.

Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов не вызывает сомнений. Большой объем экспериментальных данных получен различными адекватными методами.

Апробация результатов и личный вклад соискателя. Положения и результаты диссертационной работы доложены на 11 российских конференциях с международным участием в виде стендовых и устных докладов. По теме диссертации опубликовано 5 статей в ведущих отечественных и международных научных журналах.

Рекомендации по использованию научных выводов диссертационной работы. Полученные в диссертации результаты могут быть использованы в ряде научных учреждений: в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Институте фундаментальных проблем биологии РАН, ФИЦ химической физики РАН, Научно-исследовательском институте физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского при МГУ.

Замечания и вопросы по работе. Диссертационная работа Ю.Н. Обухова не полностью свободна от недостатков:

Замечания:

1. Биоинформатический подраздел, несмотря на интересные данные о возможном существовании белков WSCP класса II вне растений семейства *Brassicaceae*, создаёт впечатление скомканной и несколько обрезанной части работы.

2. Результаты сравнения фотоокислительной активности холобелков WSCP класса II с аналогичной активностью молекул хлорофилла в мицеллах детергента находятся в разделе «Обсуждение», в то время как более уместным было бы нахождение в разделе «Результаты».

3. Автор работы делает вывод о том, что в работе им выявлено «свидетельство протекания обратимой фотохимической реакции между хлорофиллом и остатком триптофана в холобелках WSCP класса II», хотя показана лишь потеря энергии возбуждения на, предположительно, фотохимическую активность молекул хлорофилла в составе. Предположение об участии именно триптофана в этом процессе сделано лишь при сравнении и аналогии с описанным в литературе процессом, протекающим для родственных белков группы LvWSCP. Следовало бы смягчить формулировку выводов по сравнению с формулировкой, имеющейся в работе.

4) Можно рекомендовать использовать в тексте вместо общего термина «холопротеин» более конкретного, «хромопротеин», так как BoWSCP является пигментированным белком.

Сделанные замечания носят не принципиальный характер и не подвергают сомнению корректность представленных в диссертации результатов и выводов.

Заключение. Диссертация Обухова Юрия Николаевича «Исследование фотохимических свойств водорастворимых хлорофилл-связывающих белков семейства WSCP-II» является законченным самостоятельным научным исследованием. Работа полностью соответствует паспорту научной специальности 1.5.4. Биохимия. По актуальности, объему выполненного исследования, методическому уровню, новизне полученных результатов и их значимости представленная работа полностью отвечает всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного

Постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в действующей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям а её автор, Обухов Ю.Н., заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Отзыв на диссертацию рассмотрен, обсужден и утвержден на расширенном семинаре лаборатории экспрессии генома растений ИФР РАН, протокол № 14 от 28.10.2026 г.

Отзыв на диссертационную работу Обухова Ю.Н. подготовлен ведущим научным сотрудником лаборатории экспрессии генома растений института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, доктором биологических наук Игорем Николаевичем Стадничуком.

«29» октября 2026 г.

Подпись сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук Игоря Николаевича Стадничука:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки и Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук,

к.б.н. Николай Васильевич Лобус