

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Гуриной Вероники Валериевны
«ИЗМЕНЕНИЯ ЛИПИДНОГО СОСТАВА
ВАКУОЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ КОРНЕПЛОДОВ *BETA VULGARIS* L.
ПРИ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССАХ»,
представленную к защите на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности
1.5.21 – физиология и биохимия растений

Одним из активно развивающихся современных научных направлений является выяснение механизмов, участвующих в адаптации живых организмов к стрессовым воздействиям. Поскольку растения, ведущие прикрепленный образ жизни, подвергаются самым разнообразным биотическим (бактерии, вирусы, грибы и паразиты в целом) и абиотическим стрессовым воздействиям (засоление, засуха, затопление, экстремальная температура) особую важность приобретает аспект повышения устойчивости растений к действию стрессовых факторов. Стрессовые факторы многочисленны и, в зависимости от длительности и силы воздействия на растения, могут тормозить их рост и развитие: в частности, осмотический стресс (засуха, солевой стресс, чрезмерное увлажнение) безусловно, является одним из основных абиотических стрессовых факторов, ограничивающих продуктивность сельскохозяйственных культур.

С различными изменениями в окружающей среде в живой клетке первыми сталкиваются биологические мембраны. Именно они представляют собой мишени первичного воздействия стрессовых факторов и первую линию защиты от них. Являясь динамичными структурами, мембраны способны быстро реагировать на изменения в окружающей среде изменением функциональной активности, которые сопровождаются перестройками в их структуре. При этом происходит изменение метаболизма липидов, результатом которого является адаптивная модификация липидных компонентов мембран. Однако, при сильном или длительном действии стрессового фактора может нарушаться синтез липидов и происходить их гидролиз. Модификация липидного компонента мембран в разных органах и органеллах растительного организма происходит различным образом. При этом в липидном компоненте мембран могут образовываться минорные липиды, которые функционируют в сигнальных путях клеток в качестве мессенджеров или регуляторов.

Вероника Валериевна в своей работе обратила внимание на тонопласт – мембрану, окружающую центральную вакуоль. Тонопласт благодаря полупроницаемости принимает

участие в поддержании тургора клетки, а также в регуляции транспорта метаболитов, выполняя регуляторную и защитную функции. Роль липидов тонопласта в защите растительной клетки от стресса в настоящее время мало исследована. Изучение изменения липидного состава вакуолярной мембраны при действии стрессовых факторов было ограничено лишь исследованием влияния разных видов температурного стресса на ее липидный состав. Поэтому поставленная Гуриной Вероникой Валериевной задача исследования изменений в липидном компоненте тонопласта в условиях осмотического и окислительного стрессов представляется важной как в научном, так и практическом плане: исследование молекулярных механизмов осмотических стрессовых реакций растений, в частности изменений липидного состава тонопласта при осмотическом шоке, могут иметь большое значение для создания растений устойчивых к осмотическому стрессу с помощью селекции и генной инженерии.

Прежде чем перейти к рассмотрению работы, позвольте остановиться на формальных положениях. Диссертация написана традиционно и включает следующие главы: введение, обзор литературы по изучаемой проблеме, материалы и методы, результаты исследования и обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Объем диссертации составляет 124 страницы машинописного текста, в том числе 27 рисунков и 9 таблиц. Список литературы включает 247 источников, из которых 217 опубликованы в зарубежных изданиях.

Во введении автор раскрывает актуальность поставленной проблемы, цели и задачи исследования, научную новизну работы и ее научно-теоретическое значение

Гурина В.В. отмечает, что способность растений изменять липидный состав мембран играет решающую роль при адаптации к стрессовым воздействиям. Действительно, изменения мембранных липидов могут непосредственно влиять на свойства белков, связанных с мембранами, и активность сигнальных молекул, регулируя текучесть и проницаемость мембран, активируя пути передачи сигнала. Модификация липидного компонента мембран для конкретных органелл, вероятно, может дать важную информацию о роли различных органелл в адаптации к изменяющимся условиям внешней среды при стрессе и помочь идентифицировать ключевые липидные сигнальные молекулы. В связи с этим Гурина В.В. ставит целью своей работы исследование липидного состава тонопласта корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях окислительного и осмотического стрессов для выяснения возможной роли липидов в защитных реакциях растительной клетки.

Глава 1 - обзор литературы, изложена на 41 стр. Обстоятельный обзор литературы посвящен изложению представлений о роли вакуолярной системы в жизнедеятельности клетки, структуре биологических мембран, в том числе тонопласта. Значительная часть обзора

уделена описанию путей биосинтеза липидов (жирных кислот, глицеролипидов, гликоглицеролипидов, стеридов) и особенностей липидного состава тонопласта. Во второй части обзора автор рассматривает основные механизмы протекторных реакций растений на стресс и участие липидного компонента мембран в ответ на стрессовые воздействия (осмотический и окислительный стресс). В целом обзор литературы обширен, многогранен и свидетельствует о большом литературном багаже автора.

Довольно удачным является наличие раздела «Выводы из обзора литературы». Здесь Гуриной В.В. удалось проанализировать массив полученных к настоящему времени научных данных и сформулировать те актуальные вопросы, которые остались все еще нерешенными и составили цель проведенного автором исследования.

Глава 2 посвящена материалам и методам исследования. Методы изложены полно и в дальнейшем любой научный сотрудник сможет их воспроизвести. Их арсенал широк и включает биохимические, физиологические, цитологические и некоторые другие методы. Все это свидетельствует о хорошей экспериментальной подготовке диссертанта и ее интересе к поставленной проблеме.

Далее следует обширная глава 3, в которой изложен весь экспериментальный материал. Исследуя влияния осмотических стрессовых воздействий, диссертант подвергает этим воздействиям целые корнеплоды *Beta vulgaris*, в то время как влияние окислительного стресса она изучает на кусочках ткани корнеплодов. В связи с этим в ходе работы она использует различные контроли для сопоставления эффектов исследуемых стрессовых воздействий. Автор четко показывает, что общим для окислительного и осмотических стрессов является изменение проницаемости мембран, оцениваемое по выходу электролитов из тканей корнеплода, активация перекисного окисления липидов и нарушение стабильности изолированных вакуолей, что, по мнению автора, свидетельствует о довольно интенсивной стрессовой нагрузке в условиях исследуемых стрессовых воздействий на клетки *Beta vulgaris*.

Далее Вероникой Валериевной было проведено комплексное исследование липидного компонента вакуолярной мембраны корнеплода *Beta vulgaris* при изучаемых видах стресса. Автор выделяет ряд защитных реакций растительных клеток на окислительный, гипер- и гипо- осмотический стресс, обусловленных модификацией липидов, разделяя их на специфические и неспецифические. Диссертант относит к неспецифическим модификациям липидного компонента тонопласта корнеплодов *Beta vulgaris* увеличение количества насыщенных жирных кислот (ЖК), в основном минорных жирных кислот – лауриновой (C_{12:0}), миристиновой (C_{14:0}) и стеариновой (C_{18:0}) кислоты. При этом автор отмечает, что увеличение уровня стеариновой ЖК наблюдалось только при осмотических

стрессах. К неспецифическим изменениям липидного компонента тонопласта в условиях данных видов стресса Гурина В.В. также относит снижение содержания фосфатидной кислоты (ФК), фосфатидилэтаноламина (ФЭ), повышение содержания стигмастерина, кампестерина и соотношения стигмастерин/ β -ситостерин.

Опираясь на данные литературы автор четко формулирует значение этих изменений в развитии устойчивости клеток *Beta vulgaris* к исследуемым видам стресса. Так повышение содержания короткоцепочных ЖК при различных видах стресса Гурина В.В. связывает с ролью этих ЖК в качестве сигнальных молекул, принимающих участие в регуляции экспрессии целого ряда генов. Изменения в содержании ФК она объясняет стабилизацией ламеллярной структуры мембраны. При этом Вероника Валериевна отмечает, что β -ситостерин и кампестерин играют значительную роль в упорядочении цепей жирных кислот в мембране, что может влиять на проницаемость мембраны для воды и ионов, а также на активность мембранных белков. Кроме того, кампестерин используется в синтезе brassinosteroidов, а соотношение стигмастерин/ β -ситостерин, вызывает активизацию защитных механизмов растительной клетки.

Специфические ответные реакции на стресс, как замечает автор, связаны с изменениями содержания липидов, которые различались при разных видах стресса. К ним Вероника Валериевна относит изменения содержания общих и отдельных гликоглицеролипидов (ГЛ) (моноголактозилдиацилглицерина (МГДГ) и дигалактозилдиацилглицерина (ДГДГ)), изменение содержания суммы стеринов и соотношения фосфатидилхолин /фосфатидилэтаноламин (ФХ/ФЭ). Она продемонстрировала довольно значительное снижение общего количества липидов вакуолярной мембраны при окислительном и гиперосмотическом стрессах, что может быть следствием усиления липолиза и перекисного окисления, а также ингибирования путей биосинтеза липидов. Кроме того, автор четко показала снижение соотношения ФХ/ФЭ при гиперосмотическом стрессе и увеличение этого соотношения при гипоосмотическом стрессе. Снижение соотношения ФХ/ФЭ среди мембранных липидов диссертант связывает с образованием небислойных фаз в мембране, увеличением ее проницаемости и образованием водных каналов. Вероника Валериевна демонстрирует существенное снижение количества МГДГ и ДГДГ в условиях гиперосмотического стресса и снижение количества МГДГ при гипоосмотическом стрессовом воздействии. Снижение МГДГ является обычной реакцией растений на осмотический стресс. Возможно это является следствием повышенной активности галактолипазы и липоксигеназы, которая обычно индуцируется стрессом окружающей среды. Изменения содержания ГЛ в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* при этих видах стрессовых воздействий, по мнению автора, вероятно, также связаны с образованием небислойной гексагональной липидной

фазы в мембране.

И, наконец, довольно интересные результаты были получены при изучении динамики стерина тонoplastа при стрессе. Автор демонстрирует значительное снижение суммарного содержания стерина в вакуолярной мембране при осмотических стрессах и увеличение их содержания в условиях окислительного стресса. Различное содержание стерина при разных видах стресса, по мнению диссертанта, вероятно, связано с влиянием стерина на микровязкость, проницаемость и плотность упаковки других липидов мембраны.

Экспериментальная часть работы завершается небольшим заключением, где отражены основные положения проведенного исследования, их интерпретация и обсуждение. Хотелось бы отметить, что хорошо и логично написан раздел «Заключение». Анализируя литературные данные и сопоставляя их с полученными экспериментальными данными, автор создает довольно удачную «Схему изменений липидного состава вакуолярной мембраны корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях окислительного и осмотических стрессовых воздействий», которая наглядно иллюстрирует модификацию липидного компонента тонoplastа корнеплодов *Beta vulgaris* при изучаемых стрессовых воздействиях. Суммируя полученные результаты, Гурина Вероника Валериевна отмечает, что основные защитные модификации липидного компонента вакуолярной мембраны направлены на стабилизацию липидного бислоя, увеличение содержания липидов, повышающих устойчивость к стрессовым воздействиям («стрессовых» стерина: стигмастерина, кампестерина и соотношения стигмастерин/ β -ситостерин) и изменение таких свойств мембраны как проницаемость и микровязкость.

К работе имеются небольшие замечания:

1. Наличие некоторых неточностей в тексте. Так на стр. 22 приводится формула руменово́й кислоты (октадека-9,11-диеновой кислоты) (18:2 ω 7), но диссертант почему-то ее называет олеиновой кислотой. На стр. 27 пропущено слово «цепь» в словосочетании «углеводная цепь».

2. В качестве стадий перекисного окисления липидов (ПОЛ) на стр. 34 Гурина В.В. приводит следующие стадии: «иницирование цепной реакции, распространение и прекращение». По сути такое описание стадий ПОЛ верно. Однако, в литературе приняты следующие обозначения стадий цепной реакции: инициация, развитие, разветвление, обрыв.

Данные недостатки не носят принципиальный характер и не снижают ценность рецензируемой работы. Необходимо отметить, что диссертантом выполнена большая, интересная и востребованная работа. Выводы автора содержательны и подтверждены

количественными данными, представленными в работе, и отвечают поставленным задачам. Научная новизна материала и высокий уровень исследований не вызывают сомнений. В практическом аспекте полученные данные также являются ценными, особенно для создания устойчивых к засухе, засолению и затоплению растений путем селекции или генной инженерии.

Диссертационная работа Вероники Валериевны Гуриной является законченным научным исследованием, выполненным на современном научно-методическом уровне. Полученные результаты соответствуют поставленным целям и задачам, а также заявленной научной специальности и имеют не только теоретическое, но и практическое значение. Содержание диссертации полностью отражено в автореферате и опубликовано в зарубежном издании (Planta. Издательство Springer Science+Business Media), в периодических изданиях, рекомендуемых ВАК РФ, и материалах Международных и Всероссийских конференций.

Все выше изложенное позволяет считать, что диссертационная работа Гуриной Вероники Валериевны «Изменения липидного состава вакуолярной мембраны корнеплодов *Beta vulgaris* L при абиотических стрессах» отвечает требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утверждённому постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым ВАК Минобрнауки России к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор – Вероника Валериевна Гурина – заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений.

Д.б.н., специальность: 03.01.02 – биофизика (биологические науки), ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН)



Жигачева Ирина Валентиновна

Подпись Жигачевой Ирины Валентиновны заверяю
ученый секретарь ИБХФ РАН, к.б.н.



Скалацкая Светлана Ивановна