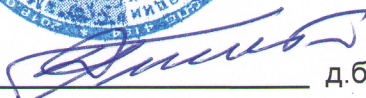




«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУН

Ботанический институт им. В.Л. Комарова
РАН

 д.б.н., Д.В. Гельтман

« 06 » апреля 2022 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Гуриной Вероники Валериевны «Изменения липидного состава вакуолярной мембраны корнеплодов *Beta vulgaris* L. при абиотических стрессах», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений

Актуальность темы

Работа В.В. Гуриной посвящена изучению мембран вакуолей – самых крупных компартментов зрелых клеток растений, связанных с запасанием белков и низкомолекулярных метаболитов (флавоноидов, антоцианов, алкалоидов и др.), детоксикацией и литическими процессами. Типичные запасрующие вакуоли в большом количестве представлены в семенах. Функционирование подобных вакуолей в запасующих органах, в т.ч. в корнеплодах, обеспечивает развитие растений, в частности, возобновление жизнедеятельности после периода покоя у двулетних растений, к каким относится объект исследования – *Beta vulgaris*. Литические вакуоли, образующиеся в ходе биогенеза запасующих вакуолей, аккумулируют протеазы, нуклеазы и другие литические ферменты, а также разнообразные защитные белки, защищающие растения от вирусов и бактерий (Shimada et al., 2018). Они связаны с аутофагией, в ходе которой деградируют макромолекулы и отдельные органеллы, а также с апоптозом, что делает их принципиально важными участниками событий, предполагающих клеточную гибель, таких, например, как реакция сверхчувствительности (Yamada et al., 2019). Также, вакуоли задействованы в регуляции водно-солевого обмена и поддержании клеточного тургора, процессинге липидных включений (Rahman et al., 2021). Фундаментальная роль этих органелл в растительной клетке диктует необходимость детального исследования структуры и функций их отдельных компонентов.

В обеспечении бесперебойной работы растительной вакуоли принимает участие окружающая ее вакуолярная мембрана (тонопласт). От способности ее компонентов контролировать растяжение, инвагинации и межмембранные контакты, избирательность трансмембранного переноса воды и метаболитов, осуществлять рецепцию и трансдукцию клеточных сигналов, поддерживать транспортную и ферментативную функции интегральных белков зависит функционирование вакуоли, и, как следствие, всего растения в целом. Важнейшую роль во всех перечисленных процессах играет липидный компонент тонопласта, представленный фосфо- и гликоглицеролипидами, сфинголипидами, стеринами. В последние годы интерес к липидам тонопласта резко возрос. В исследованиях липидома (Yoshida et al., 2013) и сфинголипидома (Carmona-

Salazar et al., 2021) вакуолярной мембраны продемонстрировано структурное разнообразие липидных молекул, выявлены отдельные уникальные характеристики липидного состава, отличающие тонопласт от других биологических мембран, в частности, от плазмалеммы. Их функции только предстоит выяснить. Диссертация В.В. Гуриной, актуальность которой очевидна, является одним из первых шагов в этом направлении.

Научная новизна

В исследовании В.В. Гуриной на примере растения-галофита сельскохозяйственного значения *Beta vulgaris* показано, какие изменения претерпевают липиды тонопласта при гиперосмотической и гипоосмотической нагрузке, условиях, которые регулирует вакуоль. Данные виды абиотических воздействий, а также окислительный стресс, лежащий в основе любого повреждения, практически не исследованы на вакуолярных мембранах. Приоритетными в этом плане, несомненно, являются работы В.В. Гуриной, выполненные в соавторстве с ее научным руководителем Н.В. Озолиной и другими коллегами (Ozolina et al., 2020, 2022). В опубликованном недавно исследовании Q. Guo (2022), проведенном с использованием другого галофита – ледяной травы (*Mesembryanthemum crystallinum*), в тонопласте в условиях гиперосмотического стресса наблюдали ряд изменений, связанных с молекулярным составом фосфо-, глико- и сфинголипидов, однако стеринавая фракция этой научной группой так и не была исследована. Таким образом, выявленные диссертантом механизмы, поддерживающие целостность вакуолярной мембраны в условиях осмотического стресса, которые включают целый комплекс липидных компонентов (глицеролипидов и стерина), являются принципиально новыми и не имеют аналогов в научной литературе. Выдвинутый В.В. Гуриной тезис, относительно специфических и неспецифических изменений липидов тонопласта в ответ на осмотический и окислительный стресс, в частности обнаруженное неспецифическое увеличение доли кампестерина и стигмастерина, резкое снижение содержания фосфатидных кислот и, напротив, стабильность фосфатидилинозитов, сформулирован впервые. Уверены, что он послужит основой для дальнейшего изучения тонких механизмов адаптации мембранных структур с участием стеринавого и глицеролипидного компонентов уже на уровне отдельных молекулярных видов липидов.

Теоретическая и практическая значимость

Фундаментальная проблема, в решение которой вносит вклад представленная диссертационная работа, уже упоминалась выше. Прежде всего, это выявление молекулярных механизмов, лежащих в основе динамических преобразований экзо- и эндомембран, способствующих поддержанию клеточного гомеостаза в условиях осмотического стресса. В практическом отношении результаты могут иметь значение при поиске признаков, обеспечивающих устойчивость растений к засолению или водному дефициту. Подобные данные могут быть полезными при выведении новых устойчивых сортов сельскохозяйственных растений, получении трансгенных растений с заданными свойствами. Полученные диссертантом сведения о составе липидного компонента тонопласта и его ответной реакции на абиотические воздействия могут быть использованы при чтении курсов лекций и составлении учебных пособий.

Основная часть

Диссертация В.В. Гуриной построена по достаточно традиционной схеме: состоит из списка сокращений, введения, литературного обзора, двух разделов, имеющих непосредственное отношение к экспериментальной части работы («Объект и методы

исследования», «Результаты исследования и обсуждение»), заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 247 источников, из них 217 зарубежных. Работа содержит 9 таблиц и 27 рисунков, общий объем составляет 124 страницы.

Во **введении** обосновывается важность изучения мембран, в частности их липидного компонента, при исследовании влияния стрессовых воздействий на растения. Рассматриваются барьерная и транспортная функции липидов как наиболее значимые при адаптации к осмотическому и окислительному стрессам. При упоминании о синтезе в стрессовых условиях «уникальных липидов» отмечается их сигнальная роль в клетке. Здесь, в качестве комментария, следует заметить, что появление новых структурных видов липидов при стрессе или адаптации к нему связано не только с их сигнальной функцией. Как известно, доминирующие молекулярные виды липидов формируют среду для мембраносвязанных белков, создавая необходимые условия, поддерживающие активность и защищающие от денатурации, в то время как минорные виды выступают в качестве аллостерических эффекторов, стабилизируя белки или их отдельные части в определенной конформации. Эта функция «уникальных липидов» становится не менее востребованной при развитии стрессовой реакции.

Также во введении сформулированы цель и задачи работы, научная новизна и практическая значимость, приведены результаты апробации и сведения о публикациях по результатам работы. Декларируется полный личный вклад автора в представленную работу. Представлены благодарности.

- Во введении встречаются некоторые неточности. Так, например, при описании новизны исследования, автор замечает, что «при всех изучаемых стрессовых воздействиях отмечено увеличение содержания минорных жирных кислот и кампестерина, снижение количества фосфатидной кислоты и отношения стигмастерин/ β -ситостерин». Однако, согласно представленным данным, увеличивается не содержание минорных жирных кислот, а их доля (или относительное содержание) в составе общих липидов, а отношение стигмастерин/ β -ситостерин не уменьшается, а увеличивается.

Обзор литературы состоит из шести разделов. В первом приводятся сведения о растительных вакуолях, их функциональном, морфологическом и биохимическом разнообразии. Здесь же дается представление о тонопласте, который, согласно последним данным, окружает не только центральную вакуоль, но и короткоживущие трансвакуолярные тяжи, которые пересекают вакуоль, обеспечивая связь между различными участками цитоплазмы. Во втором разделе представлены современные данные о структуре мембран, на наш взгляд несколько упрощенные. Отдельно обсуждается строение вакуолярной мембраны. Приводятся интересные сведения об отличиях тонопласта от плазмалеммы, в частности, характерное для него более низкое относительное содержание стерина и высокое – фосфолипидов, что придает тонопласту большую эластичность. В третьем более детально рассказывается о липидном компоненте мембран. Обобщены и очень основательно проанализированы сведения о составе жирных кислот (ЖК) тонопласта, нейтральных и полярных глицеролипидах. Менее полной представляется часть, посвященная стеринам. Четвертый раздел посвящен теории стресса, специфике окислительного, гипер- и гипоосмотического стресса. Информация изложена подробно, с необходимой критической оценкой, большой интерес представляют сведения о специфических и неспецифических изменениях липидного компонента, многие из которых практически не цитируются в литературе по данной проблеме, что свидетельствует о серьезной работе, проведенной диссертантом.

В пятом разделе обсуждаются особенности конформации различных классов липидов, влияние входящих в них ЖК на жидкокристаллическое состояние мембраны, дается оценка физиологического значения изменения основных параметров состава липидов (соотношения стерина/фосфолипиды, ФХ/ФЭ, ДГДГ/МГДГ, аккумуляции фосфатидных кислот), наблюдаемых в условиях стресса, подробно анализируются изменения во фракции моно- и дифосфатидилинозитов, влияющие на морфологию и физиологию вакуолей. Заканчивается обзор выводами, подводщими к постановке цели исследования. В целом весь обзор подготавливает читателя к восприятию основных результатов, полученных автором. Он написан хорошим языком и демонстрирует умение работать с литературой. Имеются и замечания к данной главе.

- На наш взгляд излишне лаконично выглядит второй раздел, посвященный структуре мембран. Так, например, диссертант обошел вниманием концепцию глобальной гетерогенности мембраны, объясняющую существование огромного разнообразия молекулярных видов мембранных липидов (Narayana, Riezman, 2018), а также ряд важных определяемых ими параметров, например, плотность упаковки, плотность заряда, свойства, приводящие к дезинтеграции бислоя.
- В очень основательно написанном третьем разделе обзора, который в целом производит впечатление очень вдумчивого исследования, допущены некоторые неточности: стерина, в отличие от эфиров и гликозидов стерина, принято рассматривать в качестве простых, а не сложных липидов (стр. 16) (Васьковский, 2000); в фотосинтезирующих тканях растений, содержащих в хлоропластах разветвленную сеть тилакоидных мембран, обогащенных гликолипидами, доминирующей является α -линоленовая кислота (C18:3, n-3), а у так называемых 16:3-растений – гексадекатриеновая кислота (C16:3, n-3), а не только C16:0, C18:1, C18:2, как указано в диссертации (стр. 19); ссылка на высокое содержание в липидах тонопласта длинноцепочечных ЖК, к которым, как известно, относят ЖК C-20 ряда и выше, не подкрепляется данными табл. 1 (стр. 22); в табл. 2 не содержится информации о нейтральных липидах *Beta vulgaris*, как заявлено в тексте (стр. 25); остатки ЖК присоединены сложноэфирной связью не к гидроксилу фосфорной кислоты, а к гидроксилам глицерина (стр. 27); на гликозилдиацилглицерина и гликофинголипиды можно поделить гликолипиды, а не гликоглицеролипиды, в состав которых, как следует из названия, входит глицерин, а не сфингозин (стр. 27).
- В диссертации, начиная с обзора литературы, не сказано о наличии у многих растений, к которым, в частности, принадлежит объект исследования *Beta vulgaris*, Δ^7 -стерина, имеющих двойную связь между C7 и C8 атомами углерода в стерановом ядре. Ссылка на деление стерина на 24-метил- и 24-этилстерина справедлива, если речь идет о Δ^5 -стеринах. В иных случаях, при обсуждении представителей порядков Caryophyllales, Cucurbitales и др., корректнее делить эту группу соединений на Δ^5 - и Δ^7 -стерина, соотношение которых у растений может колебаться в очень широких пределах.

Оценивая главу, посвященную **объекту и методам исследования**, хотелось бы отметить целый ряд положительных моментов. Исследование грамотно спланировано: приведены сведения, объясняющие причины выбора *Beta vulgaris* в качестве объекта; подробно описаны условия создания стрессовых состояний; большое внимание уделено образцам, послужившим контролем для различных экспериментов; проведена комплексная оценка воздействия, что позволило диссертанту аргументированно говорить о наличии стрессового состояния (в частности, определены концентрация клеточного

сока, выход электролитов из тканей, динамика содержания сопряженных двойных связей в составе липидов, динамика разрушения мембран вакуолей). Отдельно следует отметить способы выделения вакуолей и вакуолярных мембран. Данные методики, являющиеся оригинальными разработками коллектива СИФИБР СО РАН (Саляев и др., 1981; Ozolina et al., 2013), во многом обеспечили актуальность и новизну исследования. За годы работы они, по-видимому, претерпели немало модификаций, возможно, что-то было привнесено и В.В. Гуриной. В этом случае хотелось бы получить более четкое представление о вкладе диссертанта в совершенствование данных методик.

Биохимическая часть методического раздела также производит хорошее впечатление. Подробно описаны методы экстракции липидов, качественного и количественного анализа их отдельных классов, анализа жирных кислот. Их выбор адекватен поставленным задачам, полученные результаты представляются преимущественно обоснованными. Тем не менее, имеются два замечания к данной главе.

- Разделу не хватает иллюстрационного материала, например, отсутствуют хроматограммы, полученные для метиловых эфиров жирных кислот и силильных производных стерина. Поскольку *Beta vulgaris* является растением, синтезирующим большой спектр стерина, включая $\Delta 5$ - и $\Delta 7$ -стерины, а также, по-видимому, $\Delta 0$ -станолы, такая хроматограмма, полученная для стерина вакуолярной мембраны, и дополненная значениями индексов удерживания помогла бы дать более точную оценку идентификации соединений.
- Тоже относится и к данным масс-спектрометрии стерина. Поскольку для анализа TMS-производных стерина использовали колонку HP-5MS (30 м x 0,25 мм x 0,50 мкм), которая, как правило, не позволяет разделить TMS- β -ситостерин и TMS-спинастерин ($\Delta 7$ -стигмастерин), приведенные масс-спектры обсуждающихся в работе стерина, в частности β -ситостерина, решили бы многие вопросы, связанные с разделением.

Первый раздел главы, посвященный **результатам исследования и обсуждению**, демонстрирует результаты экспериментов по оценке влияния стрессовых воздействий. Как замечает В.В. Гурина в конце данного раздела «стрессовая нагрузка в условиях окислительного и осмотических воздействий была достаточно сильной». Действительно, в проведенных экспериментах показано двукратное увеличение концентрации диеновых конъюгатов при осмотических стрессах, двукратное увеличение выхода электролитов при окислительном стрессе, двукратное и четырехкратное снижение периода полураспада вакуолей при окислительном и гипоосмотическом стрессе. Подобный разброс, демонстрирует большие различия в физиологических последствиях изученных воздействий, а также, не в последнюю очередь, весьма приблизительную способность использованных методик оценить объем повреждения, его обратимость, а также сопоставить повреждающее влияние стрессоров.

Во втором разделе описывается влияние на липидный профиль тонопласта окислительного стресса. На рис. 15 и далее во всей главе обращает на себя внимание крайне низкая концентрация липидов тонопласта, обычно до 1 мкг/г сухой массы, с которой приходилось работать автору диссертации. Следует отметить, что работа с концентрациями, находящимися на пределе детектирования, требует большого профессионализма от исполнителя, а полученные результаты приобретают особую ценность. Согласно полученным результатам, на фоне заметного повреждения мембран тонопласта в ходе окислительного стресса, которое было продемонстрировано в первом разделе, изменения липидного состава оказались незначительными. Во фракции ЖК

снижение относительного содержания линолевой кислоты на 3%, которое компенсировалось увеличением концентрации насыщенных кислот, несопоставимо мало, по сравнению с увеличением содержания диеновых конъюгатов, которое увеличилось на 47%. Поскольку концентрация линолената (C18:3) в вакуолярных мембранах невелика, линолевая кислота (C18:2) становится основным субстратом окислительных реакций. Хотелось бы, чтобы диссертант пояснил, с чем может быть связана несогласованность данных по составу ЖК (табл. 4) и уровнем их окисления (рис. 12). Анализ изменений в составе индивидуальных классов липидов также не выявил, каких либо серьезных нарушений. Зарегистрированное снижение содержания фосфатидных кислот (ФК) на фоне увеличения количества дигалактозилдиацилглицеринов (ДГДГ) представляется вполне логичным. Как правило, подобная реакция, зачастую связанная с усилением эукариотического пути синтеза гликолипидов, наблюдается при многих стрессовых воздействиях. Частичное замещение фосфолипидов, синтез которых ограничивается, молекулами ДГДГ способствует поддержанию целостности и функциональной активности мембран в условиях стресса, и, как правило, сопровождается обратимыми, не очень грубыми повреждениями. Однако данные по выходу электролитов (рис. 13) и периоду полураспада мембран (рис. 14) свидетельствуют о противоположном. Здесь также требуются комментарии.

Третий раздел посвящен результатам анализа липидов тонопластов, подвергшихся гиперосмотическому стрессовому воздействию. Как и в случае окислительного стресса, реакция жирнокислотного состава оказалась крайне незначительной. Напротив, в составе фосфолипидов наблюдались более серьезные изменения, свидетельствующие о частичной инактивации процессов биосинтеза и/или усилении катаболизма. Аналогичные изменения зарегистрированы в составе гликолипидов. Эти данные соответствуют более глубоким повреждениям липидного компонента мембран. В пользу преобладания деструктивных процессов над компенсаторными говорит и снижение соотношений ФХ/ФЭ и ДГДГ/МГДГ, увеличение которых сопровождает многие стрессовые состояния вне зависимости от их природы. В.В. Гуриной удалось очень наглядно это продемонстрировать. На фоне деструкции глицеролипидов особого внимания заслуживает реакция стерина компонента, как оказалось, наиболее устойчивого к гиперосмотическому воздействию. Как и в случае окислительного стресса выявлено увеличение содержания кампестерина и значения соотношения стигмастерин/ β -ситостерин. Поскольку мы не исключаем, что содержание β -ситостерина может быть завышено из-за его неудовлетворительного разделения с $\Delta 7$ -стигмастерином, избежать которого с помощью одномерной GC-MS практически невозможно, содержание стигмастеринов как суммы $\Delta 5$ - и $\Delta 7$ -стигмастерина могло бы оказаться выше. Таким образом, динамика стигмастерина и его участие в поддержании целостности тонопластов при гиперосмотическом стрессе заслуживает не меньшего внимания, чем статистически подтвержденная динамика кампестерина.

В последнем четвертом разделе представлены данные по влиянию на липидный профиль гипоосмотического стресса. Как и в предыдущих экспериментах, его влияние на состав ЖК оказалось минимальным. Тем не менее, на фоне стабильности ненасыщенных ЖК автору снова удалось зарегистрировать незначительное увеличение относительно содержания короткоцепочечной миристиновой кислоты (C14:0). Таким образом, благодаря большим усилиям (во всех экспериментах использовано 5 биологических повторностей) и грамотной статистической обработке на очень сложном материале (не более нескольких мкг, доступных для анализа) продемонстрирован своеобразный тренд, характерный для тонопласта, увеличение концентрации во фракции глицеролипидов

короткоцепочечных кислот. Поскольку изменения в их концентрации невелики и вряд ли могут оказать влияние на физико-химические свойства мембран, не исключаем, что подобные кислоты могут входить в состав уникальных молекулярных видов липидов, роль которых в тонопласте еще предстоит исследовать. Реакция глицеролипидных классов при гипоосмотическом стрессе оказалась маловыраженной. На фоне снижения концентрации ФК и моногалактозилдиацилглицеринов, содержание других классов сохранялось на уровне контроля. Как и в предыдущих экспериментах, выявлено увеличение содержания кампестерина, стигмастерина и соотношения стигмастерин/ β -ситостерин.

В заключении и выводах автор суммирует и обобщает полученные результаты, описывает выявленные закономерности. Данный раздел представляется полностью обоснованным.

- Основное замечание к данной главе заключается в том, что в большинстве разделов диссертант ограничился описанием результатов, не представив их критического обсуждения. В ряде случаев формально использованные литературные данные не способствуют пониманию причин и следствий наблюдаемых явлений.

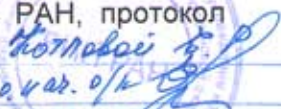
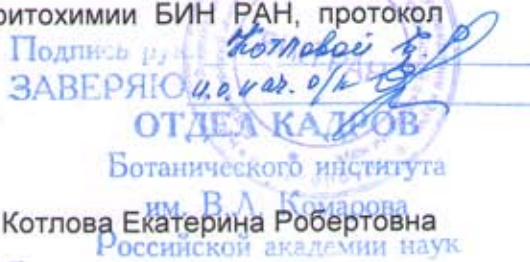
Общая характеристика работы

Работу можно считать практически первым исследованием, где было продемонстрировано влияние окислительного и осмотических стрессовых воздействий на липиды вакуолярной мембраны растительной клетки. Методы, включающие выделение тонопластов и их последующий анализ, достаточно трудоемкие, но главное, требующие от исследователя очень большого набора компетенций, т.к. соединяет в себе принципы физико-химического анализа высокого уровня, накопленный ресурс классической биохимии и использование возможностей биоинформатики. Диссертационная работа демонстрирует очень хорошее владение автором материалом, связанным с традиционными представлениями о биосинтезе и катаболизме липидов, а также современными взглядами на их роль в растительных мембранах в норме и в условиях стресса. Совмещение этих знаний с приемами биохимического анализа позволило получить целый ряд принципиально новых, интересных и перспективных результатов.

Диссертация Гуриной Вероники Валериевны «Изменения липидного состава вакуолярной мембраны корнеплодов *Beta vulgaris* L. при абиотических стрессах» является научно-квалификационной работой, оформленной на основании проведенного диссертантом законченного содержательного исследования с обоснованными выводами. По актуальности, поставленным целям и задачам, объему проведенных исследований, новизне полученных результатов, их научной и практической значимости представленная работа полностью отвечает требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24.09.2013 г, а ее автор, Гурина Вероника Валериевна, несомненно, заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – «физиология и биохимия растений». Отзыв заслушен и утвержден на заседании лаборатории аналитической фитохимии БИН РАН, протокол заседания № 1 от 5 апреля 2022 года.

Вед.н.с. лаб. аналитической фитохимии
Ботанического Института РАН, к.б.н.

5.04.22

Подпись 
ЗАВЕРЯЮ 
ОТДЕЛ КАДРОВ
Ботанического института
им. В.А. Комарова
Российской академии наук
Котлова Екатерина Робертовна