

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Новиковой Галины Викторовны о диссертационной работе Пузанского Романа Константиновича «Метаболом и профиль экспрессии генов клеток *Chlamydomonas reinhardtii* при различных трофических условиях», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

В настоящее время озабоченность проблемами энергетической безопасности и защиты окружающей среды (сокращение выбросов CO₂) привели к повышению интереса к возобновляемым источникам энергии, в частности, к жидкому биотопливу, производство которого в ближайшее время может достигнуть ~6%. Биотопливо, произведённое из пищевых источников, таких как пшеница, кукуруза, сахарный тростник, пищевые масла (первое поколение), к сожалению, ведёт к увеличению потребления, в том числе, воды и минеральных удобрений. Эти проблемы заставляют исследовать встречающуюся в природе лигноцеллюлозную биомассу (второе поколение); однако использование биомассы второго поколения имеют ограничения в производстве биотоплива, так как требуется дорогостоящая предварительная обработка лигноцеллюлозной биомассы.

Микроводоросли – недорогой и устойчивый источник биотоплива третьего поколения благодаря их высокой численности и разнообразия в природе, высокой скорости размножения и легкого производства биомассы в морской, пресноводной и сточной воде. Существующие технологии выращивания микроводорослей нуждаются в значительном улучшении. Применение подходов *algomics* в различных условиях абиотического стресса уже стало эффективной стратегией для оптимизации роста микроводорослей и производства высококачественного биотоплива. Сейчас становится всё очевиднее роль омикс-технологий в понимании структуры генома и метаболизма у различных видов микроводорослей, а применение индивидуальных и интегрированных омикс-технологий потенциально значимо для выяснения того, какие гены и метаболические пути у микроводорослей были изменены в условиях множественных стрессов. Эти, пока не слишком многочисленные данные, привели к увеличению списка тех биоконпонентов, которые могут обеспечить исследовательскую платформу для расширения генно-инженерных исследований различных штаммов микроводорослей.

Учитывая сказанное, диссертационное исследование Р.К. Пузанского, посвящённое изучению трофического режима как одного из важнейших факторов, регулирующих рост и развитие одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, безусловно, представляется новым и актуальным. Тем более, что в ближайшем будущем анализ системных изменений в клетках не столько модельных объектов (*C. reinhardtii*), сколько большего разнообразия микроводорослей будет играть значительную роль, как с теоретической, так и практической точек зрения.

Диссертация, изложенная на 366 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов и двух приложений. Здесь считаю уместным заметить, что по объёму приложения близки разделу, в котором представлены результаты. Это, по моему мнению, усиливает и без этого сильное впечатление об объёме проделанной работы. С учётом приложения работу иллюстрируют 111 рисунков и 19 таблиц. Список литературы включает 427 источников, 415 из них на иностранном языке.

По результатам диссертационного исследования опубликовано 13 работ, включая четыре статьи в журналах из перечня ВАК РФ, что согласуется с рекомендациями ВАК РФ для кандидатских диссертаций.

Во введении автор обосновывает актуальность проведения данного исследования, формулирует его цель и задачи.

Учитывая чрезвычайно большой объем данных, полученных на протяжении длительного срока, начиная с 60-х годов прошлого столетия и до настоящего времени, при написании обзора литературы перед Р.К. Пузанским стояла непростая задача: систематизировать имеющиеся представления о роли экзогенной органики в регуляции роста культур микроводорослей с акцентом на включение ацетата в метаболизм и механизмы поглощения субстратов. Диссертант, определенно, преуспел в решении этой задачи. Более того, в обзоре литературы Р.К. Пузанский обсуждает изменения активности ряда физиологических и биохимических процессов, анализирует возможное действие стрессовых факторов в условиях изменения трофических условий. Особого внимания заслуживает параграф 1.7.3. «Флюксомика». В ней Р.К. Пузанский рассматривает методы моделирования метаболизма от высоко детализированных кинетических моделей до менее сложных стехиометрических. Эти модели позволили определить, какие реакции являются незаменимыми, заменимыми и неактивными при автотрофном и миксотрофном метаболизме. Развитие данного подхода делает возможным интегрировать данные метаболомики, транскриптомики и рост культуры. Завершающий раздел обзора литературы посвящен экологическим и эволюционным аспектам миксотрофии. Несмотря на всю важность проведенного анализа данных о современном состоянии проблемы, возникает ощущение избыточности. На мой взгляд, без потери значимости, объем обзора литературы можно было бы существенно сократить, оставив лишь ту информацию, которая далее будет незаменима для интерпретации и обсуждения собственных результатов.

Следует сделать несколько замечаний (технических) по оформлению. Так, в одном предложении могут встречаться русско- и англоязычные названия метаболитов, метаболических циклов, ферментов и/или их сокращения. Практически все рисунки этой главы имеют англоязычные обозначения, которые не переведены на русский язык, хотя всегда приводятся ссылки на соответствующие первоисточники. Более того, хотелось бы видеть сплошную нумерацию рисунков, представленных в основной части текста диссертационной работы.

Следом за обзором литературы располагаются сведения об объектах и методах исследования, которые представлены достаточно подробно в соответствии с предъявляемыми к диссертациям критериями воспроизводимости. Автор приводит схему «положения» штамма *C. reinhardtii*, использованного в работе, по отношению к другим штаммам, широко используемым в мировых исследованиях (рис. 2.1), а также наглядно иллюстрирует схему проведенного исследования (рис. 2.2).

Спектр использованных в работе методов весьма разнообразен: от классических физиологических и биохимических, до таких самых современных подходов как метаболомный анализ, основанный на газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией (ГХ-МС), метод количественного РТ-ПЦР, позволяющий оценить накопление продуктов транскрипции генов интереса. Особое внимание уделено математическому анализу и подходам для визуализации данных.

Подчеркну, что многообразие методических приёмов, применённых в диссертационной работе Р.К. Пузанского, позволило, во-первых, справиться с решением поставленных задач, а во-вторых, не только продемонстрировать состоятельность в определении цели и задач исследования, но и способностью собственными усилиями достичь желаемого результата.

Далее диссертант приводит результаты своего исследования, вполне удачно обсуждая их. Попытаюсь изложить полученные результаты, как мне представляется, по степени новизны и принципиальной важности.

Начинается изложение полученных результатов с анализа характера роста и физиологической активности клеток *C. reinhardtii* при миксотрофном питании. В ходе роста культуры клеток *C. reinhardtii* метаболомный анализ с применением ГХ-МС позволил проанализировать динамику содержания более 300 соединений, 100 из которых были идентифицированы. В завершение диссертант рассматривает изменение экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты первичного метаболизма и, в широком смысле, транспортёры пластидной локализации, и соотносит выявленные изменения с отмеченной ранее динамикой метаболитов. Обнаружен постепенный сдвиг метаболизма в направлении автотрофии. Показано влияние возраста культуры на метаболом.

По аналогичной схеме проанализированы рост, активность ряда физиологических и биохимических процессов, а также интенсивность экспрессии генов интереса у культур *C. reinhardtii*, растущих автотрофно.

Изюминкой работы можно считать исследование процессов, происходящих в клетках *C. reinhardtii* после резкой смены трофической условий (после акклимации). В работе проанализированы метаболические и транскрипционные профили характерные при столь кардинальных изменениях доступности углерода и энергии. Было установлено, что наибольшие отличия, связанные с акклимацией, характерны для клеток культур в середине экспоненциального роста. При старении отличия сглаживаются.

Приведённые результаты проиллюстрированы большим числом рисунков, ряд из которых оригинальны (например, 3.42; 3.6 и др.), что, безусловно, облегчает восприятие достаточно сложного материала.

Помимо значимости и новизны полученные результаты важны для понимания фундаментальных биологических процессов у микроводорослей. Основанная на омикс-технологиях тактика может быть применена для выявления регуляции и сетевой интеграции биосинтеза/деградации метаболических предшественников, промежуточных продуктов, конечных продуктов и идентификации сетей, которые регулируют метаболические потоки. Мульти-омики смогут облегчить понимание биологических процессов и обеспечить широкий доступ к различным метаболическим путям, используемым для генетических манипуляций, что позволит сделать микроводоросли более эффективными.

Обобщает полученный в работе материал заключение, которое написано в хорошем стиле.

Завершают работу выводы, которые соответствуют цели и задачам работы и полностью основаны на представленных результатах.

Прежде чем задать вопросы, возникшие после знакомства с диссертационной работой Р.К. Пузанского, считаю необходимым поблагодарить диссертанта и его руководителей, которые цитируют теперь уже крайне «возрастные» работы В.Е.

Семенов, под руководством которого в Советском Союзе была инициирована «микророслевая история».

Вопросы и комментарии, относящиеся к работе:

1). Как уже упоминалось, сильное впечатление производит разнообразие постановок экспериментов, что у меня не вызывает принципиальных возражений, однако хотелось бы получить комментарии Р.К. Пузанского о том, на какие вопросы невозможно было ответить без проведения таких экспериментов. Особенно интересно узнать о целесообразности применения интенсивности освещения в пять раз превышающего таковую при культивировании. Более того, мне так и не удалось узнать ни из текста диссертации, ни из автореферата, какой была продолжительность «быстрой смены условий» при выращивании культур при двух трофических условиях.

2). Анализ изменений плотности использованных в работе культур *C. reinhardtii* очень сильно отличаются. Диссертант приводит вполне резонные объяснения выявленных различий. Тем не менее, они не объясняют различий плотности культур, которые представлены на рис. 2А и 8А автореферата.

3). Хотелось бы также поинтересоваться, чем обусловлено разное время и число проб в разных вариантах?

4). Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ходе роста миксотрофных культур наблюдается метаболический сдвиг в сторону автотрофии. Можно ли ожидать аналогичной тенденции при акклимации к иным трофическим условиям?

5). Поскольку наиболее значимые для достижения цели диссертационной работы результаты получены при помощи изучения изменений экспрессии некоторого набора (32) генов, считаю возможным высказать некоторые критические замечания, касающиеся результатов ПЦР в реальном времени. Возникает вопрос: чем вызван выбор как генов интереса, так и генов сравнения (нормализаторов), экспрессия которых была изучена при различных постановках экспериментов?

В работе Р.К. Пузанского мне не хватило сведений о нормализации данных ПЦР в реальном времени. Было бы целесообразно показать (например, поместить рисунки в приложении), что мРНК генов-нормализаторов стабильно экспрессируется во всех разнообразных образцах, а также что имеется корреляция между содержанием мРНК нормализаторов и суммарными количествами мРНК, присутствующими в образцах. По этому поводу хотелось бы услышать краткие комментарии автора.

6). По моему мнению, одно из наиболее значимых заключений, к которому мы приходим вместе с диссертантом, состоит в том, что «индуцированные трофическими условиями различия метаболитных и транскрипционных профилей клеток хламидомонады выражены сильнее в фазу экспоненциального роста» (вывод 5). Отсюда очевидна логика развития этой работы. Поскольку продолжительности экспоненциальных фаз так сильно отличаются, то необходимо увеличить список и анализируемых генов, и идентифицированных метаболитов. Однако это сюжет для новой серьезной работы, которая могла бы стать естественным продолжением данного исследования.

7). Стоит заметить, что диссертанту, к сожалению, не удалось избежать многочисленных опечаток, англоязычных калек, использования очень мелкого шрифта на некоторых рисунках, например, 3.4; 3.37; 3.9 и др.

Высказанные в отзыве комментарии и заданные вопросы носят дискуссионный характер и ни в коей мере не умоляют значимости представленной к защите диссертационной работы.

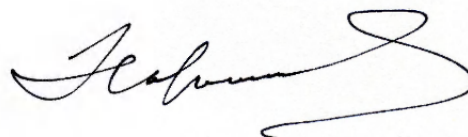
В заключении подчеркну, что Р.К. Пузанским проделан большой объём интересной и кропотливой работы, требующей исключительного внимания, огромного терпения и высокой исполнительской квалификации. Результаты и положения диссертации апробированы на всероссийских и международных конференциях. По теме диссертации опубликовано 13 работ, включая четыре статьи в журналах из перечня ВАК РФ, цитируемых в РИНЦ.

Автореферат полностью отражает основные положения, представленные в диссертации.

Диссертация Романа Константиновича Пузанского «Метаболом и профиль экспрессии генов клеток *Chlamydomonas reinhardtii* при различных трофических условиях», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, – целостная, завершённая научно-квалификационная работа, в которой содержатся новые научно-обоснованные результаты, имеющие важное теоретическое и практическое значение, а также очевидные точки дальнейшего развития.

Диссертационная работа и автореферат соответствуют требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а её автор – Пузанский Роман Константинович заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Новикова Галина Викторовна,
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт
физиологии растений им. К.А. Тимирязева
Российской академии наук, главный научный сотрудник
(специальность 03.01.05 – физиология и биохимия растений)



Новикова Галина Викторовна

127276, гор. Москва, ул. Ботаническая, д. 35.
Тел. +7(499)768-53-68; +7 (915)238-00-01,
электронная почта: gv.novikova@mail.ru

25 октября 2019 г.

