



УТВЕРЖДАЮ

Директор ФНИЦ КазНЦ РАН

академик РАН  Синяшин О.Г.

«23» октября 2019 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук» на диссертацию **Пузанского Романа Константиновича** «Метаболизм и профиль экспрессии генов клеток *Chlamydomonas reinhardtii* при различных трофических условиях», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности **03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»**.

Актуальность темы

Способность эффективно перестраивать метаболизм в зависимости от внешних условий – важнейшее свойство живых организмов, без которого невозможно было бы их существование в естественной среде обитания. Выяснение физиологических и молекулярных критериев таких перестроек составляет одну из основных задач современной фундаментальной биологии. Уникальным объектом для исследования этих вопросов являются фотоавтотрофные водоросли, способные, в дополнение к автотрофному питанию, утилизировать и органические соединения, искусно «переключая» метаболизм в зависимости от конкретной ситуации. Решению подобных научных задач значительно способствует применение современных

«ОМИКСНЫХ» подходов, позволяющих как системно характеризовать перестройки метаболизма клеток, так и выявлять метаболиты (группы метаболитов), являющиеся ключевыми «маркерами» того или иного физиологического процесса.

Диссертационная работа Р.К. Пузанского посвящена профилированию метаболомов клеток автотрофной, но осуществляющей также гетеро- и миксотрофный тип питания, водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* в разных трофических условиях и на разных стадиях роста. Проведение такого исследования не только вносит вклад в понимание общих принципов метаболических перестроек клеток, в частности в процессе акклимации, но и формирует теоретическую базу для оптимизации промышленного культивирования водорослей для получения целевых продуктов, в том числе биотоплива. Все это определяет актуальность настоящей диссертационной работы.

Научна новизна исследования

В диссертационной работе Р.К. Пузанского впервые установлено влияние трофической акклимации на метаболом и ряд других физиологических параметров (в том числе, рост, фотосинтез, дыхание и экспрессию генов) клеток хламидомонады. Продемонстрировано, что условия, в которых изначально развивалась культура, предопределяют особенности ее развития в новых условиях. При этом выявлены конкретные метаболиты и транскрипты, уровень которых различается в зависимости от условий предшествующего культивирования. В представленной работе впервые проведено столь масштабное сравнение метаболомных профилей автотрофных и миксотрофных культур хламидомонады на разных стадиях роста.

Значимую новизну представляют результаты, полученные автором, свидетельствующие, что различия в метаболомном профиле, а также в ряде других физиологических параметров, наблюдаемые у автотрофных и

миксотрофных культур хламидомонады на стадии экспоненциального роста, фактически, нивелируются при переходе в стационарную фазу роста, когда миксотрофные культуры приобретают «физиологический облик», напоминающий автотрофные культуры.

Значимость для науки полученных соискателем результатов

Результаты, полученные Р.К. Пузанским, во-первых, позволили выяснить ряд важных закономерностей в перестройках метаболизма клеток на разных этапах роста, а также при акклимации к новым трофическим условиям. Во-вторых, проведенное исследование можно рекомендовать как наглядный алгоритм, который можно использовать для характеристики метаболизма других модельных систем. И, в-третьих, работа Р.К. Пузанского обладает практической значимостью, поскольку водоросли представляют собой перспективные объекты биотехнологического производства различных метаболитов, а также биотоплива. В связи с этим, комплексная характеристика их метаболизма на разных этапах развития в разных условиях – это важная предпосылка для оптимизации подходов культивирования этих организмов.

Структура и содержание работы

Диссертация Р.К. Пузанского изложена на 366 страницах (234 страницы без учета списка литературы и приложений). Работа включает 111 рисунков, 19 таблиц, список литературы, состоящий из 427 источников (415 на иностранном языке). Диссертация построена по традиционному плану и включает список сокращений, введение, обзор литературы, описание объекта и методов исследования, изложение результатов и их обсуждение, заключение, выводы, список использованной литературы и двух приложений.

Во введении автор дает краткую сводку о метаболизме водорослей, в том числе рассказывает об объекте исследования *Chlamydomonas reinhardtii* и

о ключевом для представленной работы методе исследования – метаболомном анализе. В обзоре литературы представлено подробное описание закономерностей роста культур микроводорослей, приводится информация об ассимиляции органического субстрата и о влиянии трофических условий на рост и другие физиологические параметры клеток микроводорослей, описывается связь гетеротрофного и автотрофного типов питания, стрессовые реакции микроводорослей, рассматриваются экологические и эволюционные аспекты миксотрофии.

В главе «Материалы и методы» автор описывает использованные в работе модельные системы и методические подходы. В главе «Результаты и обсуждение» приводятся и обсуждаются собственные данные автора о влиянии трофических условий и трофической акклимации на экспрессию генов, рост и интенсивность физиологических процессов, метаболитные профили автотрофных и миксотрофных культур хламидомонады, а также обсуждается связь динамики паттерна экспрессии генов с метаболомом.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертационного исследования Р.К. Пузанского могут быть использованы для чтения лекций и проведения практикумов по физиологии растительных клеток, системной биологии, альгологии. В случае дальнейшего развития исследований они могут послужить основой для оптимизации протоколов культивирования микроводорослей для биотехнологического производства.

Замечания к работе

К представленной Р.К. Пузанским диссертационной работе есть ряд замечаний. В основном замечания касаются недочетов, которые, по всей вероятности, являются следствием чрезмерно большого объема рукописи – 366 страниц (234 страницы без учета списка литературы и приложений) при

том, что количество знаков на страницу почти вдвое превышает этот показатель у «стандартных» диссертационных работ. Создается впечатление, что главный принцип, которым руководствовался автор при подготовке диссертационного исследования, был «чем больше, тем лучше», и, к сожалению, автор не достаточно «блеснул» умением расставлять акценты и грамотно резюмировать обсуждаемый материал. В результате получился чрезмерно большой объем текста, который сложно воспринимать, в особенности, принимая во внимание следующее. Во-первых, большой объем рукописи «породил» большое количество опечаток, орфографических ошибок и неточностей в оформлении. В частности, многие рисунки представлены в рукописи (и в автореферате) до их упоминания в тексте (например, № 3.7-3.10, 3.13, 3.20, 3.21), и некоторые рисунки недостаточно информативны (например, № 3.4, 3.5, 3.15, 3.20, 3.37). На рисунке 3.12 (стр. 170) под буквами Б и В приведены диаграммы поглощения и выделения кислорода при акклимации, но про акклимацию речь заходит лишь на стр. 198, и на стр. 200 автор представляет те же самые диаграммы на рисунке 3.31. Иногда текст выглядит «не доработанным», в том числе, из-за нечеткости/неточности формулировок (например, «транскриптов ядерных генов показали значимые изменения», «транскрипционная активность клеток», «Ген SBE3, вовлеченный в синтез крахмала», и т.д.).

Во-вторых, автор не уделяет должного внимания обобщениям. Обзор литературы, который выглядит особенно громоздким и избыточным (слишком много деталей при отсутствии обобщенной картины), желательно подытоживать, указывая ключевые его положения и формулируя на этой основе целесообразность проведения запланированного исследования. В «обсуждении» тоже часто бывает сложно осознать «место» полученных Р.К. Пузанским результатов в контексте ранее существовавшего представления об исследуемых процессах. Это же касается и раздела «заклучение». В результате, необходимо потратить много сил, чтобы в столь объемной работе «отыскать» ключевые ее достоинства (хотя они, безусловно, есть).

Не совсем удачно построено «введение». Автор дает краткую сводку по теме диссертации, но фактически, недостаточно четко аргументирует актуальность исследования и не «подводит» читателя к формулировке цели и задач. Некоторые положения и названия (под)глав представлены не очень информативно; формулировки должны быть четкими и самодостаточными. В качестве неудачных формулировок можно привести следующие примеры: 1) главы: «*Ассимиляция экзогенной органики*» и «*Влияние среды на системном уровне*»; 2) положение, выносимое на защиту: «*Показано существование корреляционных кластеров генов и метаболитов. Смена трофических условий приводит к изменению кластерной структуры, преимущественно за счет усиления корреляционных связей, что свидетельствует о скоординированных метаболических перестройках*»; пока полностью не прочитаешь работу, совершенно не понятно, о чем идет речь в этом положении; 3) теоретическая и практическая значимость: «*Полученные результаты доказывают связь между пролиферацией, физиологической активностью, метаболомом и экспрессией генов, кодирующих ряд ферментов первичного метаболизма и хлоропластных транспортеров, демонстрируя функционирование клетки как целостной многоуровневой системы*»; приведенная формулировка представляется чересчур абстрактной и «связь между пролиферацией, физиологической активностью, метаболомом и экспрессией генов» и то, что клетка функционирует как целостная многоуровневая система – базовые истины, которые сами по себе очевидны.

Заключение

Несмотря на высказанные замечания, диссертация **Пузанского Романа Константиновича** «*Метаболом и профиль экспрессии генов клеток *Chlamydomonas reinhardtii* при различных трофических условиях*», представленная к защите на соискание ученой степени **кандидата биологических наук** по специальности **03.01.05 – «Физиология и биохимия**

