

## ОТЗЫВ

**Официального оппонента на диссертационную работу**

**Янучевич Елены Алексеевны**

**«Осмолиты и мембранные липиды в ответе микромицетов на стрессорные воздействия», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология**

Диссертация Е.А. Янучевич построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 106 страницах и содержит 40 рисунков и 5 таблиц. Список литературы включает 211 источников, из которых большая часть представлена публикациями на иностранных языках.

**Актуальность исследования.** Расшифровка механизмов реагирования на изменения условий существования и адаптации к ним живых систем была и остается актуальной. В процессе эволюции у разных организмов выработались определенные приспособления, позволяющие им регулировать взаимоотношения с окружающей средой. Грибы, в отличие от других групп организмов, обладают более тесным контактом со средой, обусловленным метаболической активностью всех частей организма и отсутствием слоев отмерших клеток, что предполагает существование специфичных приспособительных механизмов, формирующих их устойчивость к определенным условиям существования. На клеточном уровне эти механизмы связаны с восприятием и преобразованием сигналов, поступающих из окружающей среды, и последующей перестройкой обмена веществ. Роль пускового механизма, вызывающего сложный механизм ответа, в большинстве случаев выполняют мембранные системы. Как результат в клетке запускается ряд защитных механизмов, в числе которых – изменение состава мембранных липидов и накопление низкомолекулярных органических соединений - осмолитов.

Учитывая, что в естественных условиях организмы испытывают совместное влияние различных экологических факторов, особый интерес представляет изучение ответов на комбинированное действие разных стрессорных воздействий. В связи с этим соискателем было выполнено исследование, направленное на изучение адаптационных ответов на разнообразные индивидуальные и комбинированные стрессорные воздействия у микромицетов. Таким образом, актуальность данного исследования не вызывает сомнений. Объектами исследования стали виды грибов, различающихся по степени приспособления к различным условиям среды. Для достижения поставленной цели был определен круг задач, решение которых позволило доказать, что адаптация к стрессорным воздействиям микромицетов происходит за счет использования защитных механизмов, обеспечивающих стабилизацию макромолекул и мембран клетки. В то же время автором показано, что ответные реакции клетки, как на уровне мембран, так и на уровне низкомолекулярных осмолитов, у изученных видов зависят от особенностей вида и особенностей стрессового воздействия и/или их сочетания. В теоретическом отношении материалы диссертации позволяют значительно расширить существующие представления о закономерностях возникновения адаптаций при воздействии экстремальных факторов

разного генезиса. Практическая значимость результатов исследования, как подчеркивает автор, заключается в том, что осмолиты и фосфатидные кислоты могут быть маркерами состояния стресса у грибов; установленный рост уровня трегалозы с повышением термоустойчивости грибов необходимо учитывать при разработке методов стерилизации; а изучение комбинированных воздействий, обладающих киллерными свойствами, перспективно для разработки лекарственных препаратов против микопатогенов.

### **Общая характеристика диссертации**

**Первая часть – «ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ»** (стр. 11-29) состоит из двух глав. В первой из них автор приводит данные об основных видах стрессорных воздействий и механизмах адаптации грибов к этим воздействиям. В частности приводится описание негативного действия температурного (теплового и холодового), осмотического и окислительного видов шока на клеточные процессы, а также последовательность и особенности ответных реакций на эти воздействия у грибов. Особый акцент сделан на ответе грибов на стрессорные воздействия с позиции защиты мембран и макромолекул клетки, включающих изучение трех взаимосвязанных механизмов – изменения состава осмолитов, мембранных липидов и степени ненасыщенности жирных кислот мембранных фосфолипидов.

Вторая глава литературного обзора посвящена проблеме экстремофилии, в которой даны определения понятия и видов экстремофилии, а также описание гипотез, объясняющих существование данного феномена. На основании анализа литературных данных, по-видимому, и были выявлены аспекты, которые, по мнению автора, требовали дополнительных исследований и которые были в дальнейшем определены в качестве ориентиров для основной цели данной работы.

Во второй части, озаглавленной как **«Материалы и методы исследования»** (стр. 30-34) основное внимание удалено методикам культивирования грибов и создания условий различных стрессовых воздействий. Кроме того, приведены описания методов анализа липидов, растворимых углеводов и полиолов, статистической обработки данных. Методы, используемые для анализа липидов и жирных кислот, углеводов являются общепринятыми и не вызывают сомнений, а их применение в данной работе соответствует поставленным целям и задачам.

**Третья часть «Результаты и обсуждение»** основная в диссертации (стр. 35-85). В нескольких разделах приведены собственные результаты автора об ответах выбранных видов микромицетов на различные стрессовые воздействия. Описание результатов приводится по единой схеме, а именно: описываются ответные реакции углеводов и полиолов, мембранных липидов и жирных кислот отдельных классов фосфолипидов у 3-х групп микромицетов – мезо-, термо- и алкалофилов в ответ на действие холодового, окислительного, осмотического видов шока и их комбинированного действия. Кроме того, для термофильных грибов исследованы ростовые характеристики в зависимости от различных воздействий, а у алкалофильного микромицета *Sodiumyces alkalinus* – состав углеводов и полиолов цитозоля и мембранных липидов на различных стадиях развития.

Анализ полученных данных позволил выявить сходства и отличия ответов на различные шоковые воздействия, а также некоторые особенности, присущие экстремофильным гриbam. На примере мезофильного гриба *Aspergillus niger* показано, что, как отдельные воздействия холодового, осмотического, окислительного, так и

совместного осмотического и теплового видов шока, приводят к универсальному изменению в составе мембранных липидов – значительному росту доли фосфатидных кислот в составе мембранных липидов. Однако со стороны метаболизма низкомолекулярных осмолитов при одновременном воздействии двух видов шока наблюдается доминирование ответа на один из них и возникновение нового эффекта, нехарактерного ни одного из них.

При сравнении разных видов грибов убедительно доказано, что осмолитная система важна для адаптации грибов. При этом роль отдельных компонентов осмолитной системы зависит от вида стрессорного воздействия. Так для теплового воздействия важна роль трегалозы и для мезофильного гриба, и для термо- и алкалофилов. В то же время при адаптации к осмотическому шоку всем изученным микромицетам необходимы полиолы. В свою очередь в адаптации к окислительному шоку у всех изученных микромицетов осмолитная система участия не принимала.

Различались ответные реакции исследованных грибов на уровне молекул, входящих в состав мембран. В отличие от мезофильного гриба, у которого доля фосфатидных кислот повышалась в ответ на все виды шока, для термофилов и алкалофилов высокое относительное содержание этого класса липидов было выявлено уже при росте в оптимальных условиях. Но в ответах экстремофилов на разнообразные стрессорные воздействия со стороны мембранных липидов общей закономерности не обнаружено.

Что касается жирных кислот, значение которых в термоадаптации многих организмов хорошо известно, то, как и следовало ожидать, при адаптации к холодовому шоку у всех изученных микромицетов обнаружено повышение степени ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов. Напротив, в условиях теплового шока ожидаемого снижения степени ненасыщенности жирных кислот главных фосфолипидов не обнаружено ни у одного из грибов. В целом участие жирных кислот в адаптации грибов также зависело от характера воздействия и особенностей вида. Все полученные результаты в достаточной степени обсуждены с привлечением большого количества литературных источников.

Благодаря усилиям автора, показано: 1) экстремофильные грибы, имея мощную трегалозную защиту, в меньшей степени используют механизмы изменения состава мембранных липидов и их жирных кислот; 2) высокий уровень трегалозы и доли фосфатидных кислот у мезофильных и термофильных грибов свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что в процессе эволюции термофильные грибы приобрели способность использовать для жизни при повышенной температуре механизмы адаптации к тепловому шоку, имеющиеся у мезофильных грибов; 3) в отличие от мезофилов у термофилов не возникало приобретенной термоустойчивости после обработки тепловым шоком, несмотря на аналогичные изменения в составе мембранных липидов, в то время как резкое снижение количества трегалозы у термофилов указывает на ее особую роль в возникновении термоустойчивости.

Впечатляет в данной работе и такой раздел как «Заключение», в котором подведен итог всей проделанной работы. Выводы хорошо обоснованы и экспериментально подтверждены. Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

Оценивая работу в целом, можно констатировать, что тема исследования актуальна; существующая литература проанализирована с достаточной полнотой и глубиной;

использованные автором подходы и методы современны, результаты, представленные автором, статистически достоверны и логически непротиворечивы; выводы, приведенные в диссертации адекватны поставленным задачам. Результаты работы опубликованы с достаточной полнотой, в том числе в журналах, индексируемых Web of Science, и в ведущих рецензируемых научных журналах из перечня ВАК при Министерстве образования и науки РФ, а также апробированы на многочисленных региональных и международных конференциях и симпозиумах.

Однако, как и в любой квалификационной работе, в диссертации Януцевич Е.А. есть **недостатки и спорные моменты**, которые соискатель должен прояснить в своем ответе.

1. Название работы звучит как «Осмолиты и мембранные липиды в ответе микромицетов на стрессорные воздействия». Однако по всему тексту используется термин «шок». В связи с этим возникает вопрос, что автор подразумевает под стрессовым воздействием, и что отличает стрессовое воздействие от шока?

2. Недостаточно уделено внимания обоснованию выбора объекта исследования. Следовало бы уточнить, почему из огромного многообразия видов грибов выбрано несколько видов микромицетов.

3. В конце литературного обзора следовало бы сделать заключение об имеющихся достижениях, равно как и о недостаточной изученности проблемы.

4. Раздел «Материалы и методы» написан крайне лаконично. Отсутствуют сведения о систематике и биологии выбранных видов, а также их свойствах. Эти данные могли бы быть полезными, особенно в связи с тем, что автор постулирует в практической значимости, что изучение комбинированных воздействий, обладающих киллерными свойствами, перспективно для разработки лекарственных препаратов против микропатогенов. Без подобных сведений последний тезис в практической значимости выглядит неубедительно.

5. В отношении полученных результатов возникает несколько вопросов. Изменение в составе мембранных липидов в ответ на изменения условий обитания, и особенно в стрессовых ситуациях, хорошо известный факт. В чем специфика ответа мембранных липидов у грибов в сравнении с другими формами жизни? Что может представлять из себя мембрана, большая часть липидов в которой, судя по представленным данным для большинства грибов, не образуют бислой? В чем заключается защитный эффект фосфатидной кислоты?

6. Существует ли какая-либо корреляционная зависимость между тремя типами механизмов адаптации у исследованных микромицетов?

7. Не совсем точно указана роль десатураз в изменении степени ненасыщенности жирных кислот мембранных фосфолипидов (стр. 83).

Есть ряд замечаний технического характера.

1. Некорректное использование таких терминов, как трехатомный полиол (стр. 16) вместо трехатомный спирт, ацильные цепи жирных кислот (стр. 83) вместо просто ацильные цепи, экстракция мицелия (стр. 34) вместо экстракция липидов из мицелия.

2. На стр. 35 в ссылке на рис. 1 неверно указано снижение уровней глицерина и маннита. Судя по данным рис. 1, уровень глицерина увеличивается.

3. Стр. 65, таблица 3. В заголовке неправильно указано степень ненасыщенности основных мембранных фосфолипидов. Ненасыщенность относится только к жирным кислотам фосфолипидов. Непонятно выделение жирным шрифтом некоторых значений степени ненасыщенности жирных кислот при тепловом воздействии.

4. Не совсем понятна сквозная нумерация глав при разделении текста диссертации на три отдельных части.

5. Стр. 84. Неудачная фраза «Также было показано снижение чувствительности вязкости мембраны к колебаниям температуры в присутствии ФЭ с более ненасыщенными ацильными цепями».

Отмеченные недостатки не снижают основных достоинств работы – оригинальность, обширность фактического материала, научную и практическую значимость.

На основании изложенного считаю, что по теоретической и практической значимости, актуальности, новизне, объему материала, обобщению полученных данных и их интерпретации диссертационная работа Янукевич Елены Алексеевны «Осмолиты и мембранные липиды в ответе микромицетов на стрессорные воздействия», соответствует критериям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», предъявляемым ВАК РФ к кандидатской диссертации, а ее автор Елена Алексеевна Янукевич заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Главный научный сотрудник  
лаборатории экологической биохимии  
Института экологии Волжского бассейна РАН –  
филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Самарского Федерального исследовательского центра РАН,  
доктор биологических наук по специальностям  
экология, физиология и биохимия растений

12.03.2020

Розенцвет Ольга Анатольевна

Почтовый адрес: 445003, г. Тольятти,  
Ул. Комзина, 10.  
Тел.: +78482489209  
e-mail: olgarozen55@mail.ru

Подпись доктора биологических наук Розенцвей О.А. заверяю:  
Ученый секретарь  
Института экологии Волжского бассейна РАН  
филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Самарского Федерального исследовательского центра РАН,  
кбрн



Е.В. Быков