

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Петровой Анны Андреевны «Свойства тканеспецифичного рамногалактуронана I, обеспечивающие функционирование желатинозных волокон льна», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений

**Актуальность.** Клеточные стенки высших растений состоят из микрофибрилл целлюлозы, поперечно связанных гемицеллюлозами и погруженных в матрикс, образованный пектиновыми полисахаридами и структурными гликопротеинами. Высокая механическая прочность клеточных стенок лежит в основе многих функций, которые они выполняют в растениях, и определяет большинство полезных свойств материалов, получаемых из растительного сырья, таких как бумага, текстиль, строительные материалы из древесины.

Долгое время считалось, что прочность клеточных стенок определяется взаимодействиями между микрофибриллами целлюлозы и гемицеллюлозами. Эта точка зрения была поставлена под сомнение после недавней демонстрации того, что мутант, практически лишенный ксилоглюкана – основной гемицеллюлозы клеточных стенок двудольных, мало отличается по фенотипу и механике клеточных стенок от растений дикого типа. Данное открытие возродило интерес к роли пектинов в определении механических свойств клеточных стенок.

В клеточных стенках высших растений присутствуют три класса пектиновых полисахаридов: рамногалактуронан I, рамногалактуронан II и гомогалактуронан. В настоящее время хорошо известно, что рамногалактуронан II и гомогалактуронан могут увеличивать механическую прочность клеточных стенок через образование в них поперечных мостиков на основе бората и ионов кальция соответственно. Однако практически отсутствует информация об участии рамногалактуронана I в определении механики клеточных стенок. Учитывая то, что рамногалактуронаны I являются самыми сложными и переменными по структуре полисахаридами клеточных стенок, представляется вероятным, что они могут выполнять разные функции, в зависимости от ткани и стадии развития растения. В данном контексте тема диссертации А.А. Петровой представляется весьма актуальной. Диссертант задалась целью охарактеризовать физико-химические и механические свойства ткане- и стадийспецифичного рамногалактуронана I волокон льна для подтверждения его возможной функции в желатинозных волокнах, а именно, создания натяжения микрофибрилл целлюлозы, за счет которого волокна

приобретают сократительные свойства, обеспечивающие изменение положения в пространстве зрелых органов растения.

**Научная новизна.** В результате проделанной работы автору впервые удалось продемонстрировать способность тканеспецифичного рамногалактуронана I волокон льна к образованию прочных физических гелей, а также ассоциатов молекул, которые, в свою очередь, могут объединяться в агрегаты более высокого порядка. Данная способность может обеспечивать создание натяжения в желатинозных волокнах при захвате рамногалактуронана I латерально взаимодействующими микрофибриллами целлюлозы, что было подтверждено компьютерным моделированием с использованием метода конечных элементов. Диссертант впервые в нашей стране применила этот метод для моделирования механических свойств клеточных стенок желатинозного типа.

**Научно-практическая значимость.** В теоретическом отношении полученные данные вносят значительный вклад в понимание механизма создания контрактильных свойств волокон в зрелых органах растения, которые обеспечивают возможность изменения их положения в пространстве. На основе физико-химических методов анализа, биомеханики и компьютерного моделирования создан комплексный подход, позволяющий выявлять связь между структурной организацией полисахарида клеточной стенки и его функцией в растении *in vivo*. Результаты работы диссертанта могут быть использованы в сельском хозяйстве и биотехнологии, в частности, для создания хозяйственно-значимых культур с повышенной устойчивостью к полеганию, а также в высших образовательных учреждениях для чтения лекций по физиологии растений, гликобиологии и биофизике.

Диссертация А.А. Петровой построена по традиционной схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения результатов работы и их обсуждения, а также заключения, выводов и списка литературы. В работе процитирован 231 литературный источник, из них 211 на иностранных языках.

**Обзор литературы** состоит из пяти разделов. В первом разделе диссертант излагает современные представления о структуре и функциональных особенностях клеточных стенок желатинозного типа и формулирует гипотезу об участии рамногалактуронана I в создании натяжения в желатинозных волокнах. Во втором разделе описаны основные полисахариды, образующие желатинозную клеточную стенку. Очень хорошо и подробно описана эволюция

представлений об особенностях организации рамногалактуронана I как компонента единой сети пектиновых полимеров клеточной стенки. В третьем разделе обзора литературы приведена характеристика механических свойств полимеров растительных клеточных стенок. В начале данного раздела диссертант совершенно уместно знакомит нас с общими принципами анализа механических свойств материалов. *Недостатком данного раздела является слишком размытое определение модуля Юнга*, который диссертант определяет как физическую величину, характеризующую свойство материала сопротивляться растяжению/сжатию при упругой деформации. Здесь было бы уместно объяснить, что модуль Юнга является коэффициентом пропорциональности между напряжением, возникающим в материале, и его относительной деформацией, или, более конкретно, представляет собой наклон линии, описывающей зависимость напряжения в материале от его относительной деформации. Далее диссертант знакомит нас с современными представлениями о свойствах гелей, образованных пектиновыми полисахаридами. К сожалению, ни в данном разделе, ни в последующем тексте диссертации *автор не упоминает статьи Майка Гидли с соавторами, которые на рубеже 1990-х – 2000-х годов опубликовали целую серию работ о механических свойствах аналогов клеточных стенок - композитов целлюлозы бактерии Acetobacter xylinus с полисахаридами клеточных стенок высших растений*. В этих работах рассматривались и механические свойства композитов, образованных целлюлозой с пектинами, и их результаты было бы уместно обсудить в связи с рассматриваемой диссертантом моделью взаимодействия рамногалактуронана I с микрофибриллами целлюлозы. В четвертом разделе обзора литературы автор приводит сжатое, но весьма удачное описание возможностей и основных принципов современных физико-химических методов, используемых в диссертации для изучения свойств тканеспецифичного рамногалактуронана I волокон льна. Наконец, последний раздел обзора литературы посвящен компьютерному моделированию структуры и свойств физиологических систем. Здесь диссертант доступным языком знакомит нас с особенностями моделирования методом конечных элементов. В целом, следует отметить хорошую продуманность обзора литературы А.А. Петровой. В нем нет ничего лишнего, затрагиваются именно те проблемы, которые нашли отражение в экспериментальной части работы. После прочтения обзора литературы становится очевидным, что диссертант очень хорошо разбирается в современном состоянии исследуемого вопроса.

Оценивая раздел, посвященный **материалам и методам исследования**, хотелось бы отметить, что для описания свойств рамногалактуронана I диссертант использовала

чрезвычайно широкий спектр современных физических и химических методов анализа свойств вещества, включая компьютерное моделирование, что является несомненным достоинством диссертации. Все выбранные методы адекватны поставленным задачам и достаточно подробно описаны. Однако в данном разделе *нигде не упоминается то, как автор рассчитывала модуль Юнга на основе экспериментальных данных по сжатию гелей рамногалактуронана I*. Разъяснения по этому вопросу, приведенные в разделе результатов после Рис. 17, являются недостаточными, так как не указано, на основе какой части кривой, связывающей давление и деформацию, рассчитан модуль Юнга.

В разделе **результатов и обсуждения** диссертант не ограничивается исследованием свойств тканеспецифичного рамногалактуронана I волокон льна, но сопоставляет их со свойствами рамногалактуронана I первичной клеточной стенки картофеля. Кроме того, в части экспериментов проводится сравнение свойств тканеспецифичного рамногалактуронана I льна до и после его встраивания в клеточную стенку. В связи с этим возникает важный методический вопрос: *«Не является ли отличие свойств тканеспецифичного рамногалактуронана I льна до и после встраивания в клеточную стенку артефактом, связанным с существенными отличиями процедуры их выделения из клеточных стенок?»*. Как следует из раздела материалов и методов, рамногалактуронан I до встраивания в клеточную стенку является водорастворимым и выделяется из супернатанта после простой гомогенизации стеблей льна с последующим центрифугированием. С другой стороны, встроенный в клеточную стенку рамногалактуронан I выделяется при достаточно жестких условиях в результате длительной процедуры, связанной с предварительным удалением из клеточных стенок других матричных полисахаридов с последующим ферментативным разрушением целлюлозы. Потенциально данный протокол может изменять свойства рамногалактуронана I, встроенного в клеточную стенку. Автору диссертации следовало бы обсудить эту возможность.

Отправной точкой в исследовании диссертанта была демонстрация гелеобразующей способности рамногалактуронана I волокон льна, но не картофеля. Кроме того, оказалось, что рамногалактуронан I волокон льна после встраивания в клеточную стенку приобретает способность к формированию более прочных гелей, чем его растворимый предшественник. Все дальнейшие эксперименты были направлены на выявление факторов, объясняющих уникальную гелеобразующую способность рамногалактуронана I волокон льна. При помощи динамического рассеяния света было установлено, что рамногалактуронан I волокон льна, но не картофеля обладает высокой способностью к самоагрегированию. ИК-спектроскопия

показала, что данная способность может быть обусловлена повышенным содержанием прочно связанной воды. ЯМР спектроскопия выявила отсутствие в остове рамногалактуронана I волокон льна фрагментов гомогалактуронана, которые присутствовали в рамногалактуронане I картофеля, тогда как степень замещения остатков рамнозы остова и средняя длина олигомерных галактановых цепей у исследуемых рамногалактуронанов I были сопоставимыми. Ферментативный и химический гидролиз рамногалактуронана I волокон льна с последующим разделением полученных фрагментов гель-фильтрацией и анализом их химического состава выявил уникальную способность данного полимера сохранять свой гидродинамический объем при уменьшении остова на 90% и боковых цепей - на 98%, что является еще одним подтверждением способности рамногалактуронана I волокон льна к формированию ассоциатов молекул.

Установив ряд уникальных особенностей тканеспецифичного рамногалактуронана I волокон льна, диссертант, при помощи компьютерного моделирования с использованием метода конечных элементов, пришла к выводу о его пригодности для генерации натяжения в желатинозных волокнах при захвате данного полимера между латерально взаимодействующими микрофибриллами целлюлозы. Используемая автором модель включает три компонента: две микрофибриллы целлюлозы и расположенный между ними ассоциат рамногалактуронана I. В связи с этим возникает вопрос: *«Как данная модель соотносится с реальными размерами ассоциата рамногалактуронана I, диаметром микрофибрилл целлюлозы и относительным содержанием данных компонентов в клеточной стенке желатинозного типа, которая, как известно, отличается исключительно высоким содержанием целлюлозы?»*.

Оценивая работу в целом, можно заключить, что она решает задачу, имеющую существенное значение для физиологии и биохимии растений и полностью соответствует заявленной научной специальности. Существующая литература проанализирована с достаточной полнотой; использованные автором подходы и методы современны, результаты убедительны и логически непротиворечивы, выводы адекватны поставленным задачам. Автор исследования надлежащим образом ссылается на идеи и разработки, полученные соавторами. Результаты исследования с достаточной полнотой отражены в публикациях, в том числе в виде четырех статей в ведущих изданиях, рекомендованных ВАК, а также апробированы на многочисленных региональных и международных конференциях. Оформление диссертации заслуживает самой высокой оценки, а содержание автореферата полностью соответствует ее содержанию. В работе встречаются грамматические и

стилистические ошибки, что, однако, нисколько не умаляет общего положительного впечатления от диссертации.

Считаю, что работа Петровой Анны Андреевны «Свойства тканеспецифичного рамногалактуронана I, обеспечивающие функционирование желатинозных волокон льна» представляет собой законченный научный труд и соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений», а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

ведущий научный сотрудник  
кафедры физиологии и биохимии растений  
биологического факультета  
Санкт-Петербургского государственного университета  
кандидат биологических наук

Д.В. Суслов

25 ноября 2015 г.

Почтовый адрес: 199034 Санкт-Петербург,

Университетская наб., д. 7/9

Телефоны: +7 (812) 328 96 95, +7 921 743 18 22

E-mail: souslov@mail.ru



Подпись *Д.В. Сусллова*  
ЗАВЕРЯЮ  
*Косарева Т.В.* Косарева Т.В.  
25.11.2015.