

## ОТЗЫВ

Оппонента на диссертационную работу Никушина Олега  
Витальевича

«Влияние лигандов на поглощение ионов меди клеточными  
стенками растений вики (*Vicia sativa L.*)»

**Актуальность избранной темы.** Медь, как микроэлемент, требуется для растений лишь в небольших количествах. Однако в ряде случаев, например, при техногенном загрязнении почвы, ионы меди могут накапливаться в клетках растений до токсических уровней и приводить к нарушениям метаболизма и физиологических функций, что выражается в торможении роста. На уровне сельскохозяйственных посевов накопление ионов меди приводит к снижению урожайности и делает сельхозпродукцию токсичной. Большое число работ посвящено исследованию поглощения ионов меди, их переносу из корней в надземные органы, распределению по органам и тканям, а также влиянию избытка ионов меди на метаболизм и физиологические функции. Однако, подавляющая часть этих исследований посвящена внутриклеточным процессам. Роли клеточной стенки (КС) в поглощении ионов меди не уделялось достаточного внимания, хотя целлюлозный матрикс и пектины клеточной стенки вносят существенный вклад в сорбцию корнями тяжелых металлов (ТМ), включая ионы меди. Другой важный вопрос, не получивший достаточного освещения, состоит в том, как выделяемые корнями органические вещества влияют на сорбцию ионов меди полимерным матриксом клеточной стенки и какова роль этих веществ в устойчивости растений к избытку ионов меди в среде. Однако известно, что ряд веществ, таких, например, как аминокислоты могут образовывать с тяжелыми металлами комплексные соединения, что ограничивает поглощение ТМ растением и делает их для него менее токсичными. Очень мало работ по взаимодействию ионов меди с КС выполнено с применением физико-химических методов и подходов,

позволяющих исследовать это взаимодействие на количественном уровне. В частности, прямые определения сорбционной способности КС в отношении ионов меди и других ТМ проводятся лишь группой, в которой работает соискатель. Диссертационная работа О.В. Никушина выполнена с применением таких методов и подходов и посвящена задачам, которые долгое время оставались нерешенными, а именно выяснению  $\text{Cu}^{2+}$ -связывающей способности клеточных стенок вики посевной, оценке роли апопласта этого растения в поглощении ионов  $\text{Cu}^{2+}$  при разной концентрации этого катиона в среде и влиянию лигандов, а именно гистидина и глутамина на  $\text{Cu}^{2+}$ -связывающую способность КС вики посевной. В этой связи актуальность работы О.В. Никушина не вызывает сомнений.

Работа хорошо спланирована, что позволило четко решить задачи, которые поставлены для достижения общей цели. Описанию своих собственных экспериментов и полученных результатов предшествует обзор литературы. Он посвящен следующим вопросам: общей характеристике ТМ; рецепции ТМ клетками растений и передаче сигналов, запускающих ответ клетки на присутствие ТМ в среде; транспортным системам, через которые ТМ поступают в клетки; механизмам детоксикации ТМ, включая компартментацию ТМ в вакуолях и апопласте, синтез фитохелатинов и белков, связывающих ТМ; химическому составу, структуре и роли клеточной стенки в защите растений от ТМ. Подробно описываются ионогенные группы КС, которые связывают ТМ и роль КС в защите растений от избытка тяжелых металлов. Эти вопросы имеют непосредственное отношение к теме работы. Обзор литературы представляет самостоятельную ценность, так как полностью отражает состояние рассматриваемого в работе вопроса и является базой для постановки цели и задач данного исследования. Обзор хорошо написан и читается с интересом.

Раздел материалы и методы понятно изложен и дает четкое представление о том, как проводились эксперименты. Применяемые в работе методы и подходы выбраны корректно и позволяют считать, что главные

положения и выводы работы сделаны на надежной экспериментальной основе. Следует особенно отметить использованный метод потециометрического титрования клеточных стенок, который по полисигмоидальной форме кривых титрования позволяет определить разные типы присутствующих в КС ионообменных групп, их количество, ион-обменную способность и константы ионизации. Важным подходом является также использование в экспериментах, наряду с выделенными клеточными стенками, корней интактных растений, что дало возможность выявить вклад КС в поглощение ионов меди клетками корня. Следует также отметить удачное использование хроматографического метода в сочетании с масс-спектрометрией, что позволило соискателю получить новые данные об индукции ионами меди биосинтеза сапонинов, выполняющих, по-видимому, защитную функцию при избытке ионов меди в среде.

#### **Научная новизна и практическая значимость работы.**

В работе впервые показано, что аминокислоты гистидин и глутамин оказывают заметное влияние на поглощение ионов меди корнями и побегами растений вики посевной. Действие этих аминокислот направлено на ограничение поступления ионов меди в интактное растение. При этом было четко продемонстрировано отсутствие влияния гистидина на адсорбцию ионов меди клеточными стенками корней, и лишь небольшое усиление адсорбции под действием глутамина, что свидетельствует о существовании зависимого от этих аминокислот механизма, который тормозит поглощение ионов меди корнем.

Еще одним важным результатом работы является демонстрация усиления синтеза компонентов КС под действием ионов меди и соответствующих изменений в содержании ионообменных групп полигалактуроновой кислоты. Повышение адсорбционной способности клеточных стенок корней и побегов растений может быть ключевым защитным механизмом при высоких концентрациях ионов меди в среде.

К достижениям соискателя следует отнести также демонстрацию экссудации тритерпеновых гликозидов корнями вики посевной в условиях избытка ионов меди в среде. Впервые для растений рода *Vicia* показано индуцированное ионами меди выделение тритерпеновых гликозидов (сапонинов). В работе высказывается предположение о роли тритерпеновых гликозидов в защите растений от избытка ионов меди.

Полученные соискателем результаты расширяют фундаментальные знания о действии ионов ТМ на растения и механизмах, лежащих в основе защитных реакций растений на повышение концентраций  $\text{Cu}^{2+}$  в среде. Полученные данные могут быть использованы при чтении лекций по минеральному питанию растений и механизмам устойчивости растений к ионам тяжелых металлов.

**Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.** Достоверность полученных результатов и сформулированных выводов обеспечивается грамотной постановкой экспериментов, использованием в работе комплекса современных методов исследования и всестороннего анализа полученных данных, отвечающих современному научному уровню, статистической обработкой полученных данных и подтверждается положительным рецензированием при опубликовании результатов работы в журналах, рекомендованных ВАК.

Соискатель подробно анализирует совокупность полученных результатов и сопоставляет их с известными литературными данными, делая заключение о важной роли карбоксильных групп полимерного матрикса КС клеток корней в связывании  $\text{Cu}^{2+}$ , что препятствует их проникновению в протопласты клеток корня и транслокации в надземные органы, о защитной роли аминокислот гистидина и глутамина, а также, возможно, сапонинов в защите растений от ионов меди, присутствующих в среде в высоких концентрациях.

На основании анализа полученных экспериментальных данных и сопоставления их с имеющимися в литературе публикациями автором сформулированы выводы, которые подводят конкретные итоги данной работы. Выводы обоснованы и соответствуют полученным автором диссертационной работы экспериментальным данным.

### **Замечания.**

(1) Было бы желательно исследовать эффекты ионов меди не только при 10 и 100 мкМ, но и при более высоких концентрациях в среде. Во многих случаях, особенно в побегах, эффект  $\text{Cu}^{2+}$  исчезающе мал. На фоне более высоких концентраций  $\text{Cu}^{2+}$  действие лигандов могло бы проявиться более ярко и вскрылись бы новые закономерности.

(2) Очень не хватает графической обобщающей схемы в разделе ЗАКЛЮЧЕНИЕ, описывающей защитную роль лигандов и смену стратегий (переход от связывания ионов меди в клеточной стенке корней к блокированию их поступления в корень), о чем говорится в тексте.

(3) Хотелось бы более четкого изложения гипотезы о защитной роли лигандов и сапонинов.

(4) Из текста диссертации не ясно, принимают ли участие в связывании ионов меди второй тип карбоксильных групп (карбоксильные группы гидроксикоричных кислот), обнаруженный автором в клеточных стенках исследуемого растения.

Указанные замечания в основном носят дискуссионный характер или относятся к оформлению работы и не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертационная работа отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова для работ на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Содержание диссертационной работы соответствует

паспорту специальности 1.5.21 – «физиология и биохимия растений» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Никушин О.В. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – «физиология и биохимия растений».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,  
ведущий научный сотрудник лаборатории  
транспорта ионов и солеустойчивости  
Федерального Бюджетного Государственного  
Учреждения Науки,  
Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева  
Российской Академии Наук  
Балнокин Юрий Владимирович

Контактные данные:

тел.: ; e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:

03.00.12.– «Физиология растений»

Адрес места работы:

Россия, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35,  
Федеральное Бюджетное Государственное  
Учреждение Науки,  
Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева  
Российской Академии Наук  
Лаборатория транспорта ионов и солеустойчивости  
Тел.: ; e-mail:

04.04.2024

Подпись Юрия Владимировича Балнокина удостоверяю:  
Начальник отдела кадров ИФР РАН