

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Кретиніна Сергія Володимировича „Вплив брасиностероїдів на ліпідну сигналізацію та метаболізм клітин рослин за дії стресів”, подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 02.00.10 - біоорганічна хімія

Дисертаційна робота Кретиніна С.В. присвячена дослідженню участі брасиностероїдів у регуляції метаболічних реакцій та сигнальних систем у клітинах рослин за стресових умов.

З'ясування особливостей реакцій рослинних клітин на дію природних та штучних фітогормонів є актуальним завданням біоорганічної хімії, біохімії та молекулярної біології. Брасиностероїди є унікальним класом стероїдних гормонів рослин, дія яких у наномолярних концентраціях реалізується внаслідок зв'язування з рецепторним комплексом BRI1-BAK1 на рівні плазматичної мембрани клітини. У подальшому така взаємодія ініціює низхідний каскад регуляторних реакцій, що призводить до перепрограмування транскриптому. Дані реакції можуть мати визначальне значення для стрес-адаптації рослин. На сьогодні механізми регуляції даних реакцій на молекулярному рівні залишаються малодослідженими. Відомо, що реалізація біологічної дії фізіологічно активних сполук (включаючи брасиностероїди) може відбуватись на рівні низки сигнальних систем клітин рослин. Серед таких - шляхи ліпідної сигналізації, сигнальна система йонів  $Ca^{2+}$ , механізми продукції активних форм кисню та ін. Дослідження механізмів залучення даних регуляторних систем рослинної клітини до реалізації біологічної дії брасиностероїдів є надзвичайно важливим питанням. Фосфоліпази є ключовими елементами шляхів ліпідної сигналізації, що забезпечують продукцію сигнальних сполук (вторинних посередників ліпідної природи) внаслідок гідролізу фосфоліпідів мембран. Фосфоліпази також приймають участь у шляхах біосинтезу багатьох ліпідів, включаючи запасні тригліцериди. Фосфоліпази залучені у більшість реакцій рослин на дію чинників стресової та гормональної природи. Показано, що фосфоліпази опосередковують біологічну дію низки фітогормонів, включаючи саліцилову та абсцизову кислоти. Однак, роль фосфоліпаз та біологічно активних ліпідів у реалізації біологічної дії брасиностероїдів залишається нез'ясованою. Також не визначеними залишаються ефекти дії брасиностероїдів на такі важливі процеси рослинної клітини, як мітохондріальне дихання та гомеостаз активних форм кисню – параметри, що

можуть мати визначальне значення для адаптації рослин в умовах дії стресів. Надзвичайно важливим є дослідження впливу брасиностероїдів на олійну продуктивність рослин, що може мати вирішальне значення для розробки методик підвищення продуктивності галузі біопалива.

З огляду на вищезазначене робота Кретиніна С.В., метою якої було з'ясування первинних реакцій метаболізму клітин рослин на дію брасиностероїдів та формування стійкості рослин за умов сольового стресу, є актуальним дослідженням, результати якого можуть не лише мати важливе значення для теоретичного обґрунтування механізмів внутрушньоклітинної дії брасиностероїдів, але й мати практичне значення для розробки біотехнологічних методик підвищення продуктивності сільськогосподарських рослин, включаючи олійні культури, за умов вирощування на збіднених ґрунтах.

Дисертаційна робота була виконана у відділі молекулярних механізмів регуляції метаболізму клітини Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України в рамках бюджетних тем та проектів НАН України та ДФФД України.

Дисертаційна робота є добре структурованою, її мета і завдання є чітко визначеними та добре співставляються з отриманими результатами та сформульованими висновками. Робота містить наступні розділи: вступ, огляд наукової літератури, розділи, присвячені представленню та обговоренню результатів експериментальних досліджень, висновки та список цитованих публікацій. Викладення матеріалу є послідовним та вдало доповнюється використанням схем та ілюстрацій.

В огляді наукової літератури наведено дані щодо сучасного стану досліджень, спрямованих на з'ясування ролі брасиностероїдів у регуляції метаболічних реакцій клітин рослин. Розділ написано на високому професійному рівні. Представлено дані щодо участі брасиностероїдів у регуляції ростових реакцій рослин, диференціації клітин, проростанні насіння та регуляції руху проростків. Проаналізовано літературні дані щодо можливої участі брасиностероїдів у регуляції продуктивності рослин та олійних культур, зокрема. Окрім цього, представлено свідчення важливої ролі фосфоліпаз у реалізації стресових реакцій рослин, а також участь діацилгліцерол кіназ у функціонуванні систем трансдукції сигналів ліпідної природи у рослин. Проведений автором аналіз даних літератури з обраної тематики досліджень є гарним підґрунтям для розробки схеми експериментальних досліджень, спрямованих на з'ясування ролі брасиностероїдів у контролі реакцій метаболізму та функціонування сигнальних систем за умов дії стресів.



У розділі 2 «Матеріали та методи» описано біохімічні та молекулярно-біологічні методи, що були використані у роботі. На особливу увагу заслуговують методики аналізу продукції вторинних месенджерів ліпідного походження у тканинах рослин *in vivo*. З цією метою застосовували мічення фосфоліпідів мембран радіоізотопами та флюоресцентними зондами. З метою аналізу такого важливі фізіологічного показнику, як інтенсивність дихального ланцюгу мітохондрій, використовували методи полярографії. З метою аналізу рівня ендогенного накопичення брасиностероїдів було застосовано високочутливий метод імуноферментного аналізу. Використані у роботі методи є різноплановими та дозволяють всебічно оцінити роль брасиностероїдів у регуляції метаболічних реакцій клітин рослин за нормальних умов росту та за дії стресів.

У розділі 3 представлено результати дисертаційної роботи та наведено їх узагальнення та обговорення. Експериментальну частину роботи представлено у семи окремих підрозділах. У першому підрозділі дисертантом представлено отримані результати аналізу участі брасиностероїдів (24-епібрасинолід) в механізмах регуляції активності фосфатидилхолін-гідролізуючих фосфоліпаз рослин. Експерименти було проведено за використання двох важливих олійних культур – рослин ріпаку та ріжю. Показано, що дана реакція опосередковує контроль олійної продуктивності таких рослин, а також жирнокислотний склад їх запасних олій. Аналіз участі фосфатидилхолін-гідролізуючих фосфоліпаз у контролі олійної продуктивності був також доповнений використанням модельних рослин арабідопсису. Наведено результати біоінформатичного аналізу експресії генів арабідопсису, що дозволив вказати на гени *KCS9*, *FAE1*, *FATA1*, *LTPG2*, *FAR1*, експресія яких знижується в умовах засолення та активується за дії брасиностероїдів, як можливі мішені дії даних фітогормонів у шляхах підвищення олійної продуктивності рослин за дії стресів.

Окрім даних щодо впливу брасиностероїдів на активність фосфоліпаз, у роботі представлено аналіз залучення брасиностероїдів у контроль активності дихального енергообміну тканин коріння проростків ріпаку за оптимальних умов росту, а також за дії сольового стресу. Отримано дані щодо участі брасиностероїдів у контролі як цитохромного шляху дихання, так і дихання, що відбувається за участю альтернативної оксидази. У роботі представлено новий підхід щодо контролю рівня продукції АФК брасиностероїдами в клітині на рівні мітохондрій. Показано, що адаптивна дія брасиностероїдів за умов дії сольового стресу може опосередковуватись контролем дихальних процесів у клітині, які, окрім іншого, лімітують токсичну продукцію АФК за дії засолення.



Автором також представлено дані щодо ролі брасиностероїдів у підвищенні рівня продукції супероксид-аніон радикалу та активності супероксиддисмутази у листі тютюну. За допомогою використання трансгенних рослин *sax1*, дефектних за кальцієвим сигналінгом, показано, що даний ефект перебуває в залежності як від наявності йонів  $Ca^{2+}$  у середовищі росту рослин, так і від функціонального стану внутрішньоклітинного кальцієвого сигналінгу у клітинах рослин. Також у розділі наведено дані щодо проаналізованих ефектів дії брасиностероїдів на рівень активності аскорбатпероксидази та глутатіонредуктази, а також вміст відновленого глутатіону у рослин. Показано, що ці ефекти здатні опосередковувати вплив брасиностероїдів на продуктивність та ріст рослин тютюну. Ці дані представлено у підрозділі 3.3 дисертаційної роботи.

Експериментальному підтвердженню важливої ролі йонів  $Ca^{2+}$ , а також системи ліпідної сигналізації у реалізації біологічної дії гормональних та стресових чинників присвячений наступний підрозділ роботи. Показано, що активація фосфоліпази Д за умов дії сольового стресу є кальцій-незалежною. Однак, аналіз рослин *sax1* показав, що відсутність функціональної системи кальцієвого сигналінгу обумовлює підвищення рівня накопичення малонового діальдегіду – маркеру ушкодження мембран – та зниження активності низки ферментів антиоксидантного захисту за дії засолення у тютюну. Застосування інгібітору активності фосфоліпази Д – *n*-бутанолу – справляло подібний ефект, пригнічуючи рівень стійкості рослин.

Гравітропічна реакція рослин є одним з ключових механізмів адаптації рослин у середовищі росту. У розділі 3.5 дисертаційної роботи наведено дані, які свідчать про те, що брасиностероїди впливають на гравітропізм рослин кукурудзи за нормальних умов росту, а також за дії засолення. Окрім цього, за допомогою використання трансгенних рослин *sax1* показано роль йонів кальцію у гравітропічній реакції тютюну.

Серед експериментальних даних, отриманих дисертантом, також представлено ті, що вказують на ендогенне накопичення брасиностероїдів у тканинах кукурудзи за дії низькотемпературного стресу. Ці дані можуть вказувати на те, що брасиностероїди здатні приймати участь у реакції рослин на дію низки абіотичних стресів - включаючи сольовий та низькотемпературний стрес. Окрім цього показано, що роль брасиностероїдів у стресовій стійкості рослин може реалізовуватись шляхом зменшення втрат води внаслідок транспірації через продихи. У роботі наведено дані, що вказують на участь брасиностероїдів у регуляції руху продихів у рослин ріпаку як за нормальних, так і за стресових умов. Таким чином, у дисертації



наведено низку можливих механізмів дії брасиностероїдів у регуляції продуктивності та стійкості рослин за дії абіотичних стресів.

У підсумку хотілося б відзначити, що у дисертаційній роботі Кретиніна Сергія Володимировича чітко сформульовано мету та проведено великий об'єм експериментальної роботи, спрямованої на дослідження різних аспектів участі брасиностероїдів у клітинній регуляції. Це дозволило успішно вирішити поставлені наукові задачі та сформулювати наукоємні висновки. Зокрема, у роботі представлено схему участі брасиностероїдів у регуляції метаболічних реакцій клітин рослин із залученням фосфоліпаз Д та С, діацилгліцеролкіназ, йонів  $\text{Ca}^{2+}$ , а також шляхів регуляції клітинного дихання та продукції активних форм кисню за стресових умов. Робота написана гарною науковою мовою, легко читається та сприймається, хоча в деяких місцях по тексту зустрічаються не значні граматичні та орфографічні помилки.

Щодо експериментальної частини дисертаційної роботи необхідно зауважити, що у кальцієвому сигналінгу у рослинній клітині приймає участь надзвичайно велика кількість переносників кальцію та кальцій-чутливих елементів. Кальцієві антипортери вакуоль  $\text{CAHX1}$ , безперечно, є одними з ключових компонентів даної системи. Однак, доцільним є також визначення ролі інших клітинних транспортерів кальцію у досліджуваних процесах.

З метою дослідження їх ролі у реалізації біологічної дії брасиностероїдів цікаво було б застосовувати фармакологічні підходи за використання специфічних інгібіторів транспорту кальцію або *null* мутанти. Дослідження їх функцій дозволить тісніше пов'язати функції ліпідного сигналінгу та активності мітохондрій в реалізації дії гормонів.

Представлені у розділі 3.5 оглядові дані щодо особливостей перебігу гравітропічної реакції у рослин доцільніше було б навести у огляді літератури.

Однак наведені зауваження мають рекомендаційних характер і не знижують загального враження про роботу і дисертація Кретиніна С.В. в цілому є завершеним актуальним самостійним дослідженням, виконане на сучасному науковому рівні, характеризується новизною одержаних експериментальних даних і достовірністю та новизною висновків. За обсягом і рівнем виконаних досліджень, їх викладом, отриманими практичними результатами, оформленням та ілюстрованістю дисертаційна робота заслуговує позитивної оцінки. Основні результати є новими і цілком достовірними, вони повністю опубліковані в авторитетних виданнях, а також обговорювалися на чисельних наукових конференціях та зібраннях.

Висновки науково обґрунтовані та адекватні поставленим завданням. Зміст автореферату дисертації повністю відображає основні положення роботи.

Отже, дисертаційна робота Кретиніна Сергія Володимировича „Вплив брасиностероїдів на ліпідну сигналізацію та метаболізм клітин рослин за дії стресів” є закінченою науковою працею, виконаною на високому теоретичному та методологічному рівнях, яка за своїм змістом, важливістю отриманих результатів та оформленню відповідає вимогам Міністерства освіти і науки України, а її автор безумовно заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 02.00.10 - біоорганічна хімія.

Завідувач лабораторії клітинної  
біології та нанобіотехнології  
ДУ «Інститут харчової біотехнології  
та геноміки НАН України»,  
доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України

 А.І. Ємець

