

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.

Актуальність теми. У сучасних дослідженнях механізмів регуляції стрес-толерантності рослинних організмів особлива увага надається біологічно активним речовинам, що здійснюють запуск морфогенетичних процесів адаптації та забезпечують протидію найрізноманітнішим стресовим чинникам. З'ясування молекулярних механізмів гормональної регуляції стрес-толерантності рослин знаходиться сьогодні на вістрі проблем біоорганічної хімії, тісно пов'язаних із забезпеченням сталості сільськогосподарського виробництва за несприятливих умов, зумовлених глобальними змінами клімату.

Формування антистресових програм у рослинах сьогодні пов'язують з брасиностероїдами – фітогормонами стероїдної природи, через їхню екологічну безпечність та здатність викликати біологічні ефекти у низьких, порівняно з іншими групами фітогормонів, концентраціях. Брасиностероїди досліджені як ефективні ендогенні регулятори росту, що зумовлено специфічною ріст стимулюючою активністю та захисною дією по відношенню до стресових агентів. Разом з тим механізми стрес-протекторної, зокрема солезакисної, дії брасиностероїдів досліджені недостатньо, тож всебічне їхнє вивчення становить задачу актуальну, як з наукової, так і з практичної точок зору.

Мета розглянутої роботи полягала у встановленні ролі первинних реакцій метаболізму клітин на дію брасиностероїдів за умов абіотичного стресу з використанням в якості модельних об'єктів рослини дикого типу, різних видів та трансгенні форми. Для досягнення поставленої мети було сформульовано низку завдань, спрямованих на з'ясування впливу брасиностероїдів на активність фосфатидилхолін-гідролізуючої фосфоліпази С з використанням флуоресцентно-міченого BODIPY-фосфатидилхоліну. Вивчити вплив БС на активність ферментів, задіяних у контролі рівня активних форм кисню в клітинах рослин за дії сольового стресу. Визначити *in vivo* вплив БС на активність електронтранспортного ланцюгу мітохондрій клітин ріпаку. на активність альтернативної оксидази мітохондрій рослин та на процеси метаболізму запасних ліпідів рослин арабідопсису та ріпаку.

Дисертаційна робота виконувалась у відділі молекулярних механізмів регуляції метаболізму клітини Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України в рамках бюджетної теми Інституту «Роль фосфоліпаз та антиоксидантних систем в гормональній та стрес сигналізації» (№ 0110U000378) та проектів: «Розробка способів підвищення олійної продуктивності з допомогою фізіологічно активних сполук та модифікації ліпідного метаболізму для використання як джерела біодизелю», цільової

комплексної програми наукових досліджень НАН України “Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії” (№ 0113U003668) та проекту Державного фонду фундаментальних досліджень України «Взаємодія гравітропічного та стресового сигналів у реалізації реакцій направленої росту на різних рівнях організації рослин» (№ 0114U005043).

Обґрунтованість наукових положень, їх достовірність та новизна.

Дисертація побудована за традиційною схемою і містить вступ, огляд літератури (3 підрозділи), методичну частину, обговорення отриманих результатів, висновки, заключення (вірніше писати узагальнення) та список використаних джерел. Проаналізовано сучасні уявлення щодо взаємодій БС та інших фітогормонів у регуляції ряду фізіологічних процесів клітини, зокрема, процесів елонгації клітин і регуляції клітинного цитоскелету, та їх ролі у формуванні адаптаційних реакцій метаболізму за умов стресу.

Ознайомлення з літературним оглядом (дисертантом опрацьовано 550 літературних джерел, з них лише 3 – україномовні) свідчить про належне оволодіння автором наявними літературними даними з теми дослідження.

Методична частина містить широкий набір сучасних біохімічних та біофізичних методів.

Особисто автором виконано значну, як за об’ємом, так і за різноманітністю залучених сучасних методів, експериментальну роботу. Внаслідок проведеного дослідження отримано нові дані, що істотно поглиблюють наші уявлення щодо участі брасиностероїдів в трансдукції сигналів за участю клітинних ліпідів та їх роль у формуванні стійкості до дії стресорів, зокрема сольового.

Визначено роль діацилгліцеролу у якості безпосереднього попередника синтезу запасних ліпідів а також фосфатидної кислоти (ФК), як вторинного посередника ліпідної природи у клітинах рослин. Виявлено, що дія 24-епібрасиноліду зумовлювала швидку продукцію вторинних посередників сигнальних систем: ДАГ та ФК, що свідчить про активацію ФХ-ФЛС рослин ріпаку та рижію. За умов сольового стресу у рослин ріпаку встановлено більш інтенсивну активацію ФЛД, порівняно з такою у ФХ-ФЛС. Вміст тригліцеридів був специфічно зниженим у насінні мутантних рослин арабідопсису із нокаутуваними ізогенами ФХ-ФЛС, що вказує на участь ФХ-ФЛС в синтезі ліпідів. БС сприяли підвищенню вмісту запасної олії та продуктивності насіння ріпаку за умов засолення. Показана участь іонів кальцію в реалізації біологічної дії БС. Також, автором дисертації вперше було проаналізовано динаміку вмісту ендогенних брасиностероїдів за умов абіотичного стресу і виявлено акумуляцію цих гормонів у рослин кукурудзи за дії стресору. Подібна деталізація видається виправданою і заперечень не викликає. Аналіз вказаних процесів забезпечує формування цілісної картини щодо молекулярних основ гормональної сигналізації, їх участі в метаболізмі клітини як основи в процесах росту рослин та їх розвитку.

Результати досліджень свідчать, що брасиностероїди є перспективними біологічно активними сполуками застосування яких у малих концентраціях здатне індукувати активність фосфоліпаз, задіяних у адаптаційних реакціях метаболізму рослин та сприяє забезпеченню врожайності олійних культур на

засолених ґрунтах, що є перспективним для використання у технологіях аграрного виробництва в зонах ризикованого землеробства.

Обґрунтованість та достовірність отриманих автором експериментальних результатів базується на використанні сучасних методів ізотопного мічення фосфоліпідів клітин (^{33}P), флуоресцентного мічення тканин фосфатидилхоліном (фосфоліпід) із флуорофором BODIPY; полярографії рослинних тканин, інгібіторного аналізу для визначення активності цитохромного та альтернативного шляхів дихання; тонкошарової хроматографія фосфоліпідів рослинних тканин; рідинної хроматографія ліпідів рослин для аналізу жирнокислотного складу тригліцеридів, біохімічні методи визначення активності ферментних систем та методів математичної статистики. Методологія постановки експерименту витримана, хоча в розділі «Матеріали і методи» не обґрунтовано вибір рослинних об'єктів для постановки модельних дослідів, не зазначено походження трансгенних рослин.

Вважаю, що розглянута робота виконана на належному науково-методичному рівні і є завершеним дослідженням, в якому вирішено вагому та перспективну щодо практичного застосування наукову задачу.

Зроблені на підставі проведених досліджень висновки в цілому відповідають поставленим меті, завданням роботи, отриманому матеріалу і заперечень не викликають.

За рівнем опублікованості матеріалів роботи (7 статей у фахових наукових журналах та 12 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових з'їздах і конференціях) дисертаційна робота повною мірою відповідає існуючим вимогам.

Дисертаційна робота С.В.Кретиніна оформлена згідно вимог ДАК, принципів зауважень до роботи немає, однак слід зауважити на формулювання назви з використанням понять стрес та стресор. В даній редакції назви роботи доцільно вживати «за дії стресора» - тобто фактора (надлишку йонів Na) що діє на рослинний організм, а не стресу, - який за Г.Сельє означає фізіологічний стан організму в якому він знаходиться за дії несприятливого чинника.

Визначення об'єкта здійснено некоректно. За положенням ДАК це «процес або явище, що породжує проблему...».

Тому об'єктом дослідження є процеси гормональної сигналізації.

В узагальнюючій схемі досліджено механізму доцільно вказати що це гіпотетична модель дії брасиностероїдів.

Водночас є кілька запитань до здобувача. Як з водної витяжки рослин можна здійснювати екстракцію ліпідів? (розд.Матеріали та методи). Можливо малось на увазі з сирої маси рослин.

Так, у роботі досліджувалися процеси формування АФК та вплив БС на активність альтернативної оксидази, однак, не вказано можливі механізми активації вказаного ензиму. Альтернативна оксидаза може регулюватися як на

рівні експресії генів так і шляхом регуляції пулу сформованих неактивних білків. Крім того, самі АФК також можуть впливати як на активацію білків альтернативної оксидази, так і на підвищення експресії генів які кодують ці білки. Вважаю, що у разі продовження цих досліджень потрібно провести аналіз регуляції генів альтернативної оксидази.

У роботі також було знайдено дрібні орфографічні помилки, невдалі вирази (рівень проліну, малонового діальдегіду, замість вміст проліну, ТБК-активних продуктів) та побутові назви рослин (рослини кресу, стриги).

Наразі, наведені зауваження не знижують наукову та практичну значимість роботи в цілому.

Вважаю, що дисертаційна робота Кретиніна Сергія Володимировича "Вплив брасиностероїдів на ліпідну сигналізацію та метаболізм клітин рослин за дії стресів" за актуальністю, обсягом і змістом проведених досліджень, за науковою новизною та практичним значенням одержаних результатів відповідає вимогам п.п. 11,12,13 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія.

Офіційний опонент,
доктор біологічних наук,
зав. кафедрою Фізіології та екології рослин
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка», професор



Н.Ю.Таран

Вчений секретар Київського
національного університету
імені Тараса Шевченка

ПІДПИС ЗАСВІАЧУЮ
ВЧЕНИЙ СЕКРЕТАР НАЧ
КАРАУЛЬНА Н.В.
10.10.2015

Н.В.Караульна

