

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Кокорева Олександра Ігоревича

на тему «**Стрес-протекторний вплив поліамінів на рослини та його функціональний зв'язок з сигнальними посередниками**»,  
представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія»

### Актуальність теми дисертаційної роботи

Поліаміни являють собою аліфатичні азотовмісні сполуки з регулярним просторовим розташуванням позитивних зарядів. Вони виявлені у рослин, тварин і мікроорганізмів. У рослин поліаміни розглядаються як поліфункціональні стресові метаболіти, за несприятливих умов їх кількість у клітинах може зростати на порядки. Екзогенні поліаміни мають здатність підвищувати стійкість рослин до абіотичних стресорів різної природи, зокрема до гіпертермії. Поряд з прямим протекторним впливом на біомакромолекули і антиоксидантною дією поліаміни можуть залучатися в процеси клітинного сигналіngu. Це зумовлено насамперед тим, що під час окиснення поліамінів ді- і поліаміноксидазами утворюється пероксид водню, який є достатньо стабільною активною формою кисню, завдяки чому має чималий сигнальний потенціал і розглядається як самостійний посередник. Поряд з утворенням  $H_2O_2$  внаслідок підвищення вмісту поліамінів у рослинних клітинах зазвичай також зростає вміст оксиду азоту, що перебуває у центрі багатьох адаптивних і патологічних процесів. Проте в цілому уявлення про механізми стрес-протекторної дії на рослини поліамінів та про зв'язок між їх залученням у процеси клітинного сигналіngu і формуванням конкретних захисних реакцій дотепер не сформувалися.

Зважаючи на це, дисертаційне дослідження Кокорева О.І., спрямоване на встановлення ролі ключових сигнальних посередників, зокрема, АФК, оксиду азоту, сірководню та іонів кальцію у реалізації стрес-протекторної дії



ді- і тетраамінів на рослини за гіпертермії та зневоднення, без сумніву є актуальним.

Результати досліджень впливу екзогенних поліамінів на стійкість рослин до гіпертермії та нестачі вологи у зв'язку з модифікацією активності антиоксидантних ферментів і вмісту низькомолекулярних поліфункціональних протекторних сполук; встановлення участі АФК, оксиду азоту, сірководню та іонів кальцію в реалізації захисної дії поліамінів на проростки пшениці за умов гіпертермії; дослідження впливу діамінів на активність діаміноксидази і нітратредуктази як можливих ферментів синтезу NO та встановлення функціональних зв'язків між оксидом азоту і пероксидом водню при реалізації стрес-протекторних ефектів путресцину і кадаверину; визначення дії екзогенних поліамінів на функціонування дихального апарату рослин та дослідження участі іонів кальцію і компонентів ліпідного сигналіngu в реалізації їх ефектів мають наукову новизну, теоретичне і практичне значення.

#### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційні дослідження виконувалися в рамках НДР кафедри ботаніки і фізіології рослин Харківського національного аграрного університету ім. В.В. Докучаєва – «Роль сигнальних посередників і сполук з гормональною активністю у формуванні адаптивних реакцій рослин на абіотичні стресори» (№ держреєстрації 0117U002427; Згідно з наказом МОН України № 198 від 10.02.2017) та «Механізми індукування компонентів стрес-протекторної системи рослин» (2016-2020 рр.) (№ держреєстрації 0117U002514), а також гранту за програмою «Grants for Multidisciplinary research teams 2020 of Ministry of Foreign Affairs of the Czech Republic. Direction curator – Czech University of Life Science, Prague» (проекту Czech Republic Development Cooperation «Платформа AgriSciences для розвитку науки у вищих навчальних закладах України»).

## **Наукова і практична новизна отриманих результатів.**

У дисертації вперше одержані такі нові наукові результати:

1. Проведено на одному модельному об'єкті (інтактних коренях етіолозованих проростків пшениці) комплексне дослідження участі основних компонентів сигнальної мережі рослинних клітин (АФК, оксиду азоту, сірководню, іонів кальцію) у реалізації стрес-протекторної дії поліамінів.
2. Встановлено, що індукування теплостійкості рослин і ферментативної антиоксидантної системи дією екзогенного путресцину включає в себе підвищення вмісту цитозольного кальцію в клітинах, зростання активності діаміноксидази і пов'язане з ним підвищення кількості оксиду азоту і пероксиду водню, які виконують роль сигнальних посередників.
3. Показано, що у розвитку теплостійкості проростків пшениці за дії путресцину бере участь сірководень, вміст якого в тканинах зростає у присутності цього діаміну. Ефект активації путресцином антиоксидантних ферментів усувається дією антагоністів сірководню. Водночас комбінований вплив на проростки путресцину і донора сірководню NaHS у певному діапазоні концентрацій спричиняє посилення впливу цих агентів на антиоксидантну систему і теплостійкість.
4. Доведено як схожість, так і відмінність механізмів впливу двох діамінів – путресцину і маловивченого кадаверину – на ферментативну антиоксидантну систему проростків пшениці, зокрема, здатність кадаверину спричиняти підвищення активності СОД без участі АФК як сигнальних посередників.
5. Досліджено значення надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів та участь сигнальних інтермедіатів, що утворюються за участю фосфоліпаз С і D, в реалізації впливу поліамінів на стан продохів.

Практичне значення полягає в тому, що дисертаційне дослідження поглиблює уявлення про механізми стрес-протекторної дії поліамінів на рослини, пов'язані з їх залученням в процеси клітинного сигналіngu. Це створює підґрунтя для включення поліамінів в групу практично значимих фізіологічно активних речовин зі стрес-протекторними ефектами.

Встановлений у ґрунтовій культурі за умов посухи, наближених до природних, стрес-протекторний вплив фоліарної обробки путресцином і сперміном на інтактні зелені рослини пшениці дозволяє розглядати цей прийом як перспективний для підвищення посухостійкості рослин у польових умовах.

Отримані дані розширюють фундаментальні знання у галузі клітинного сигналіngu і можуть бути використані під час викладання загальних і спеціальних курсів з фізіології і біохімії рослин в класичних, аграрних і педагогічних ЗВО, а також при проведенні досліджень у галузі фізіології стійкості рослин.

**Повнота викладення наукових положень, результатів і висновків роботи в опублікованих працях.**

За матеріалами дисертації опубліковано опубліковано 17 наукових праць, у тому числі 10 статей у фахових виданнях, з них 2 у журналах, що входять до наукометричної бази SCOPUS, а також тези доповідей у збірниках матеріалів і праць міжнародних наукових конференцій. Одержані дисертантом основні експериментальні дані добре відображені у публікаціях.

**Оцінка змісту дисертаційної роботи та її завершеності.**

Дисертація викладена на 176 сторінках комп'ютерного набору, складається зі вступу, п'яти розділів (огляд літератури, опис методів досліджень та використаних об'єктів, три експериментальні розділи), висновків та списку бібліографічних посилань, що включає 250 джерел. Дисертаційна робота ілюстрована 45 рисунками і 1 таблицею.

В анотації наведено узагальнений виклад основного змісту дисертації, результати дослідження, наукова новизна та практичне значення роботи.

У вступі обґрунтовано актуальність теми дисертації, її зв'язок з науковими темами, сформульовані мета роботи та завдання для її досягнення.

Огляд літератури присвячено аналізу сучасного стану досліджень про поліаміни, їх локалізацію, синтез і катаболізм у рослин; залучення поліамінів у процеси клітинного сингалінгу та участь у клітинних механізмах стійкості рослин. Огляд охоплює велику кількість джерел літератури, переважна більшість з яких – публікації останнього десятиліття.

В розділі 2 «Матеріал, умови і методи досліджень» описано об'єкти досліджень, схеми дослідів, методики аналізів. Перелік сучасних біохімічних, спектрофотометричних, статистичних методів вказує на адекватність вибору методичних підходів і достовірність отриманих результатів.

У розділі 3 «Індукування поліамінами стійкості рослин до гіпертермії» (першому експериментальному) показано, що діаміни путресцин, кадаверин та тетраамін спермін спричиняли істотне підвищення стійкості проростків пшениці до теплового стресу. Максимальне підвищення виживаності проростків після ушкоджуючого прогріву відзначалося при використанні поліамінів в концентрації 1 мМ. Стрес-протекторна дія сперміну була дещо вищою, ніж ефекти діамінів. При цьому відзначалося підвищення активності антиоксидантних ферментів СОД, каталази і гваяколпероксидази як в коренях, так і в пагонах проростків пшениці.

Отримані результати вказують на участь АФК, іонів кальцію і газотрансмітерів (оксиду азоту і сірководню) в прояві фізіологічних ефектів поліамінів в коренях проростків, зокрема, під впливом як путресцину, так і кадаверину. Підтверджує це використання антагоністів АФК, яке дало автору можливість встановити, що вплив кадаверину на активність окремих ферментів антиоксидантної системи може здійснюватися без посередництва АФК. З використанням антагоністів кальцію показано ймовірну участь іонів

$\text{Ca}^{2+}$  в процесі індукції антиоксидантної системи і теплостійкості проростків пшениці екзогенним діаміном путресцином.

Показано роль оксиду азоту, що синтезується за окиснювальним шляхом, і його функціональної взаємодії з АФК та іонами кальцію в реалізації стрес-протекторної дії путресцина на коренях проростків. Між цими трьома посередниками, ймовірно, є тісні прямі і зворотні зв'язки. Ферменти, задіяні в синтезі АФК і NO, є кальційзалежними.

Отримані результати дозволили автору зробити висновок про можливу участь сірководню як посередника при індукуванні путресцином теплостійкості проростків пшениці та їх антиоксидантної системи. У подальших дослідженнях доцільно з'ясувати характер взаємодії сірководню з іншими сигнальними посередниками (АФК, NO, іонами кальцію) при індукуванні стресостійкості рослин путресцином.

У розділі 4 «Вплив екзогенних поліамінів на стійкість рослин до зневоднення» автором встановлено, що путресцин і спермін у досить широкому діапазоні концентрацій пом'якшували рістінгібуючу дію осмотичного стресу. У варіантах з обробкою поліамінами не тільки посилювався ріст пагонів і коренів в умовах дії ПЕГ 6000, а й збільшувалося співвідношення маса проростків/маса коренів. Максимальний позитивний ефект спостерігався при використанні путресцину і сперміну в концентраціях 1 мМ, при цьому стрес-протекторний вплив сперміну був більш помітним, ніж дія путресцину.

Обробка путресцином викликала підвищення вмісту в проростках проліну при осмотичному стресі, в той час як під впливом сперміну він знижувався. Екзогенні поліаміни не чинили помітного впливу на вміст цукрів, але сприяли підвищенню вмісту антоціанів у пагонах. Також під впливом сперміну відбувалося підвищення вмісту безбарвних флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В.

Встановлено, що обприскування рослин путресцином в концентраціях діапазону 0,25-5 мМ істотно зменшувало рістінгібуючий вплив посухи, дія

сперміну була менш ефективною. Захисний вплив поліамінів на дорослі рослини пшениці за умов посухи зумовлений насамперед регуляцією водного обміну та попередженням розвитку окиснювальних пошкоджень. При цьому внесок окремих складових протекторного впливу на етіоловані проростки пшениці при осмотичному стресі і дорослі рослини за посухи у ґрунтовій культурі має певні відмінності.

У розділі 5 «Регуляція екзогенними поліамінами продихового апарату рослин» автором з використанням інгібіторного аналізу, показано інкубація епідермісу листків гороху в середовищі з додаванням путресцину або сперміну в концентраціях діапазону 0,25–5 мМ спричиняла зменшення величини продихової апертури і що цей процес є кальційзалежним. Отримані дані також вказують на причетність компонентів ліпідного сигналіngu до регуляторного впливу поліамінів на стан продихів.

У висновках досить чітко сформульовано основні результати роботи.

Отже, дисертаційна робота Кокорева Олександра Ігоревича є завершеним науковим дослідженням, що має наукову новизну та практичне значення.

### **Питання і зауваження до дисертаційної роботи**

1. У розділі 3.1. автор показує захисну дію поліамінів, а саме путресцину і сперміну, на пагонах проростків пшениці при тепловому стресі, що супроводжувалася підвищенням активності ключових антиоксидантних ферментів і зменшенням окиснювальних пошкоджень, особливо за дії сперміну. Далі у розділі 3.2 з'ясовується, що більш зручним об'єктом для вивчення механізмів зміни редокс-гомеостазу є корені інтактних проростків і поліамін путресцин, а надалі кадаверин. Відповідь на питання, а для чого проводили першу частину дослідження, знаходимо на сторінці 81. Також було виявлено значну схожість ефектів екзогенних кадаверину і путресцину, які є діамінами і досить схожі за структурою. Питання, чому не використовували тетраамін спермін, враховуючи відмінності за структурою

та виявлені ефекти у розділі 3.1? Чому у розділі 3.1 не визначали динаміку активності діамінооксидази?

2. Про те, що іони кальцію задіяні в процесі посилення утворення пероксиду водню, могли б вказати дані з динаміки вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі (1, 2, 4, 24 години) порівняно з піками утворення  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Проте, динаміка вмісту цитозольного кальцію дисертантом спеціально не досліджувалася. При цьому отримані дані з впливу антагоністів кальцію на активність антиоксидантних ферментів в проростках, оброблених путресцином, демонструє, що процес може залежати як від надходження кальцію з позаклітинного простору, так і з внутрішньоклітинних компартментів.

3. Розділ 3.2.3. Якщо допустити, що ДАО впливає на деградацію поліамінів і утворення  $\text{NO}$  та  $\text{H}_2\text{O}_2$ , чому пік для  $\text{NO}$  через 1 годину, а для  $\text{H}_2\text{O}_2$  на 2 години? Можливо порівняння динаміки активності ДАО за умов утворення  $\text{H}_2\text{O}_2$  і  $\text{NO}$  дали б відповідь. Відомо, з літературного огляду, що  $\text{Cu}$ ДАО впливає на вміст  $\text{NO}$  опосередковано, через утворення пероксиду водню, а спермін менш ефективно окислюється ПАО, і, таким чином початковий невеликий пул  $\text{H}_2\text{O}_2$  може індукувати утворення  $\text{NO}$ , а потім зростає рівень  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

4. Сторінка 98. Рис. 3.19. Активність ДАО, а в тексті «викликала зменшення вмісту оксиду азоту в коренях (рис. 3.19)», вірогідно рис. 3.20. Обробка проростків інгібітором ДАО аміногуанідином зменшувала активність ферменту і повністю нівелювала її підвищення, спричинюване путресцином (рис. 3.18, А) і далі три посилання на цей рисунок помилкові, по тексту це рисунок 3.19.

5. Значний літературний огляд у кожному розділі дещо ускладнює однозначне сприйняття отриманих результатів, ймовірно, це пов'язано з нестачею інформації з досліджуваних питань і іноді з різним трактуванням вже отриманих даних на різних рослинних об'єктах.

6. У роботі подекуди трапляються орфографічні помилки та редакційні огріхи.



Наведені вище зауваження не зменшують наукову цінність дисертації Кокорева О.І. не впливають на її позитивну оцінку.

### **Відсутність порушення академічної доброчесності**

В результаті всебічного аналізу тексту дисертації не було виявлено порушення автором вимог доброчесності. Використані ідеї, результати і тексти інших авторів мають посилання на відповідне джерело, дотримано вимоги норм законодавства про авторське право. У роботі не виявлено ознак академічного плагіату, фабрикації, фальсифікації. Для всіх публікацій у співавторстві чітко зазначено особистий внесок дисертанта.

Анотація відображає основний зміст дисертаційної роботи. Вона не містить положень чи ідей, що не наведені в основному тексті.

### **Висновок**

Аналіз представлених до розгляду матеріалів та положень дисертаційної роботи «Стрес-протекторний вплив поліамінів на рослини та його функціональний зв'язок з сигнальними посередниками», свідчить, що за обсягом, науковою новизною, теоретичним і практичним значенням робота відповідає вимогам «Тимчасового порядку присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 167 від 06.03.2019 р., а її автор – Кокорев Олександр Ігоревич, безумовно заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент

кандидат біологічних наук, доцент

кафедри молекулярної біології та біотехнології

біологічного факультету Харківського

національного університету імені В.Н. Каразіна *А.В. Голтвянський*



*А.В. Голтвянський* засвідчую:

*06.12.2021 р.*