

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Минибаевой Фариды Вилевны

на диссертационную работу **Никеровой Ксении Михайловны**
«Активность ферментов антиоксидантной системы при изменении сценариев
ксилогенеза у *Betula pendula* Roth и *Pinus sylvestris* L.»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений

Диссертационная работа К.М. Никеровой посвящена выявлению роли окислительно-восстановительного гомеостаза в формировании древесины. Вопрос изучения формирования древесины, в том числе, механизмов, контролирующих его протекание, имеет долгую историю. В настоящее время стало очевидным, что формирование древесины – это генетически детерминированный процесс. Многие гены, вовлеченные в различные стадии ксилогенеза, охарактеризованы в таких модельных растениях, как *Arabidopsis thaliana* и *Zinnia elegans*. Созданы мутанты с измененной дифференциацией клеток проводящих тканей. Известно, что наряду с генетическим предопределением, на ксилогенез могут оказывать влияние условия окружающей среды и внутриклеточные факторы. Одним из важнейших факторов является окислительно-восстановительный гомеостаз клеток. Образование активных форм кислорода (АФК) является побочным продуктом работы электронтранспортных систем в ходе нормального метаболизма живых клеток. Повышение образования АФК рассматривается в качестве универсальной стрессовой реакции. Последствия повышенного уровня АФК могут быть как токсичными для клетки вследствие развития окислительного стресса, так и положительными, например, при защите от патогена. Кроме того, АФК являются сигнальными молекулами, участвующими в процессах роста и развития растений. Тем не менее, вопросы о молекулярных мишенях АФК и регулируемых ими процессах, в частности, при формировании древесины, остаются дискуссионными. Особую остроту приобретает проблема выяснения роли АФК и редокс-гомеостаза в процессах формирования аномальной древесины с нарушением соотношения и пространственной ориентации ее структурных элементов. Такие нарушения проявляются в виде узорчатой древесины у карельской березы и косослойной древесины у сосны обыкновенной. В связи с этим, актуальность работы К.М. Никеровой и ее соответствие тенденциям мировой науки не вызывает сомнений.

Диссертационная работа К.М. Никеровой довольно обширна, изложена на 201 странице машинописного текста, включает 46 рисунков и 6 таблиц, оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми ВАК. Работа построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора данных литературы, описания материалов и методов исследования, изложения и обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 604 (!) работы на русском и английском языках. Во «Введении» автор обосновывает актуальность выбранной темы, формулирует цель и задачи исследования, характеризует ее научную новизну, теоретическую и практическую значимость, формулирует основные положения, выносимые на защиту.

Глава «Обзор литературы», изложенная в четырех подразделах, представляет собой анализ современных представлений о формировании структурных аномалий у древесных растений. Кроме того, автор уделил большое внимание описанию АФК и антиоксидантных ферментов, их роли в процессах роста и дифференциации клеток растений, формирования клеточных стенок, связи с фенольным и углеводным метаболизмом. В завершение обзора литературы в подразделе, посвященном поиску маркеров формирования ксилогенеза, автор фокусирует свое внимание на роли редокс-параметров в качестве маркеров различных стадий ксилогенеза.

Экспериментальная часть работы начинается с подробного описания объекта исследования и методов, использованных в диссертации. Хотелось бы отметить, что для достижения поставленной цели автором были использованы разнообразные и сложные объекты. Так, особенности формирования узорчатой древесины К.М. Никерова анализировала не только в двух контрастных по структуре древесины видах березы, но и в сезонной динамике в разные месяцы года, а также внутри одного ствола в образцах с разной степенью структурных аномалий и в листьях разновозрастных сеянцев березы. В дополнение к узорчатости автором была исследована косослойность древесины в сосне. Несомненно, работа с таким количеством непростых объектов требует от исследователя трудолюбия, концентрации внимания и самоотдачи. Для достижения поставленных задач автором применялся широкий круг классических методов физиологии и биохимии растений, в частности, измерение активности ферментов углеводного метаболизма, антиоксидантных ферментов, анализ содержания целлюлозы, лигнина и фенолов. Из

весомых плюсов особо хочется отметить применение в работе разнообразных методов статистической обработки для анализа полученных данных.

Результаты диссертационной работы К.М. Никеровой изложены последовательно и раскрывают суть выполненного исследования. Одним из основных достижений настоящей работы является выявление закономерностей изменений активности окислительно-восстановительных ферментов в древесине различной степени аномальности. Автор справедливо задает вопрос (с. 106), в чем причина повышения редокс-активности при формировании аномальной древесины? На мой взгляд, изменение активности редокс-ферментов может быть обусловлено как субстратным обеспечением, так и изменением микроокружения ферментов, в частности, значения рН, которое смещается при активации апопластной инвертазы, а также степенью связанности ферментов с элементами клеточной стенки. Данные по активности антиоксидантных ферментов в сочетании с данными по углеводному обмену, уровню лигнина и фенолов свидетельствуют о том, что при формировании аномальной древесины смена приоритетного направления утилизации сахаров в клетках ксилемы сопровождается усилением лигнификации клеточной стенки, которая опосредована повышением активности редокс-ферментов. Таким образом, на основании комплекса полученных данных автором показана возможность использования активности антиоксидантных ферментов в качестве биохимического маркера разных сценариев ксилогенеза. Еще одним важным результатом является вывод о том, что активность редокс-ферментов в стебле и листьях имеет диагностическое значение для аномального ксилогенеза у карельской березы уже на самых ранних этапах онтогенеза. Это, несомненно, подтверждает генетическую предопределенность формирования древесины и может быть использовано в мероприятиях по диагностике качества древесины.

Автором получены оригинальные данные о том, что формирование косослойной древесины у сосны обыкновенной также сопровождается возрастанием активности пероксидазы и полифенолоксидазы и увеличением метаболизации сахарозы в апопласте. Это свидетельствует об универсальности возможной роли редокс-опосредованных механизмов при формировании аномальной древесины и представляет большой фундаментальный интерес.

Таким образом, в диссертации К.М. Никеровой представлены оригинальные данные, отличающиеся новизной и представляющие фундаментальную и практическую значимость. Результаты исследования иллюстрированы рисунками и таблицами. Полученные результаты подвергнуты тщательному обсуждению с аргументированной интерпретацией и применением данных литературы. Выводы в диссертационной работе сформулированы достаточно четко и соответствуют задачам проведенного исследования.

При общем благоприятном впечатлении о диссертационной работе и положительной оценке диссертации К.М. Никеровой хотелось бы высказать замечания и задать некоторые вопросы, которые, впрочем, носят лишь дискуссионный характер.

1. Раздел Обзор литературы. В качестве замечания можно отметить перегруженность и неточность схемы, представленной на рис. 4, и неточность схемы, представленной на рис. 5. Кроме того, на мой взгляд, некоторые фразы о роли АФК, например на с. 28, 29, 34, представляются не совсем продуманными.

2. Раздел Материалы и методы. К сожалению, методика анализа активности антиоксидантных ферментов вызывает некоторые вопросы. Так, непонятно, почему для всех ферментов не был проведен стандартный кинетический анализ с определением K_m и V_{max} ? Почему не для всех ферментов была определена рН зависимость? В тех экспериментах, где рН зависимость была исследована (данные рис. 12 и 13), хотелось бы порекомендовать использование других, более адекватных рН-ряду буферов. Насколько экспериментальные условия, подобранные для измерения активности ферментов из листьев, адекватны для таковых из древесины?

3. Раздел Результаты и обсуждение. Рассуждения о роли АФК, в частности, H_2O_2 , и антиоксидантных ферментов были бы более убедительными при наличии данных об уровне АФК. Кроме того, важной могла бы быть информация об изоформах супероксиддисмутаза, пероксидаза и полифенолоксидаза. Это можно пожелать в качестве перспективы исследования.

4. Следует более осторожно рассуждать о «взаимосвязанной каскадной работе ферментов окислительно-восстановительных системы при разных сценариях ксилогенеза» (с. 105). В диссертации это заключение сделано на основании корреляционного анализа, что, конечно, недостаточно для такого громкого вывода. Очевидно, что каскадность,

обусловленная разными сигнальными процессами, например, вовлечением протеинкиназ, взаимозависимыми изменениями в активном центре ферментов, активность факторов транскрипции и пр., не исследовалась в данной работе. Разнообразие окислительно-восстановительных ферментов клеточной стенки, их изоформ, субстратов, множественность источников и разнообразие АФК (в том числе, и феноксильные радикалы), несомненно, вносят свой вклад в сложный комплекс редокс-опосредованных процессов в ходе ксилогенеза.

Минорные замечания:

- В тексте присутствуют опечатки, жаргонные и неудачные выражения: «стресс»-рост (с. 22), «Метаболические потоки АФК» (с. 33). Некоторые предложения начинаются с «Также», «Поэтому» «А». Есть разница в форматировании некоторых ссылок.

Высказанные вопросы и замечания не носят принципиального характера и не умаляют оригинальности и достоверности полученных данных. Более того, работа К.М. Никеровой, несомненно, имеет перспективы развития.

Заключение. Диссертация Никеровой Ксении Михайловны посвящена актуальной теме. В результате проделанной работы поставленные задачи решены полностью, на современном научно-методическом уровне. Выводы обоснованы экспериментальными данными и отражены в печатных работах. Достоверность полученных результатов обеспечена использованием в работе комплекса современных и классических методических подходов исследования. Автореферат и опубликованные работы отражают содержание диссертации.

Таким образом, учитывая актуальность и научную значимость диссертационной работы К.М. Никеровой, новизну полученных результатов, высокий теоретический и экспериментальный уровень работы, аргументированность выводов, считаю, что диссертация К.М. Никеровой является завершенной научно-квалифицированной работой, в которой содержится решение одной из приоритетных задач физиологии и биохимии растений. Диссертация Никеровой Ксении Михайловны соответствует требованиям, изложенным в п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного Постановлением правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата

биологических наук, а ее автор Никерова Ксения Михайловна заслуживает присуждения ученой степени кандидата наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент

доктор биологических наук,
специальность 03.01.05 - физиология и биохимия растений,
главный научный сотрудник лаборатории
окислительно-восстановительного метаболизма,
Казанского института биохимии и биофизики –
обособленного структурного подразделения
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
«Федеральный исследовательский центр
«Казанский научный центр
Российской академии наук»

Минибаева Фарида Вилевна

420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31
Тел. (843)292-73-47
minibayeva@kibb.knc.ru

21.09.2020

*Подпись Минибаевой Ф.В. заверено.
Депутатом: Лаз (Минибаева)
И.И.*

