

**ОТЗЫВ официального оппонента  
на диссертацию на соискание ученой степени  
доктора биологических наук Брейгиной Марии Александровны  
на тему: «Активные формы кислорода как регуляторы  
взаимодействия между мужским гаметофитом и спорофитом семенных  
растений» по специальности 1.5.21 Физиология и биохимия растений**

*Актуальность темы.* Активные формы кислорода (АФК), играют двойственную роль в биологии растительного организма. С одной стороны, они способны инициировать окислительный стресс, сопровождающийся повреждениями и гибелью клеток и организма, а с другой, – являются сигнальными молекулами, которые способствуют формированию адаптивных механизмов и повышению устойчивости организма. В последнее время концепция оксидативного стресса, при котором АФК рассматривались как вещества, неизбежно окисляющие различные соединения, окончательно сменилась на концепцию, которая рассматривает АФК в качестве ключевых сигнальных молекул в широком спектре сигнальных путей. Получены убедительные доказательства регуляторных функций АФК в регуляции пролиферации и дифференцировке клеток в меристемах, прорастании семян, движении замыкающих клеток устьиц и программированной гибели клеток. В диссертационной работе М.А. Брейгиной впервые получены убедительные доказательства того, что АФК выполняют сигнальные функции в регуляции прогамной фазы оплодотворения.

*Новизна исследований.* Цель и задачи диссертационной работы М.А. Брейгиной охватывают большой список нерешенных проблем в механизмах взаимодействия пыльцы и пыльцевых трубок с тканями рыльца и столбика. В исследовании М.А. Брейгиной впервые выявлена роль АФК, ионных каналов и протонной помпы в регуляции *прогамной фазы оплодотворения*, т. е. тех процессов, которые происходят от момента попадания пыльцы на рыльце до вхождения пыльцевой трубки в зародышевый мешок. Впервые установлено, что АФК продуцируются рыльцем цветковых растений и женской шишкой хвойных растений, а также генерируются прорастающим пыльцевым зерном.

Изучена динамика продукции АФК на рыльцах растений до и после опыления, оценена активность ферментов редокс-метаболизма на рыльцах и выявлено значение АФК для эффективности опыления. Обнаружено, что регуляция прорастания пыльцевых зёрен активными формами кислорода свойственна не только цветковым, но и хвойным растениям. В системе *in vitro* показано, что в регуляцию прорастания мужского гаметофита семенных растений вовлечены  $H^+$ -АТФазы, анионные каналы,  $K^+$ -каналы и  $Ca^{2+}$ -проницаемые каналы. М.А. Брейгиной впервые установлено, что мишенями АФК при прорастании пыльцевого зерна являются протонная помпа, анионные и катионные каналы.

*Содержание и оформление диссертации.* Диссертация М.А. Брейгиной изложена на 238 страницах, построена по традиционному плану и включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Объекты и методы исследований, Результаты и обсуждение, Заключение и Выводы. Список литературы содержит 501 наименование. Работа иллюстрирована 80 рисунками и 10 таблицами.

Литературный обзор состоит из двух разделов. Первый раздел посвящен подробному анализу физиолого-биохимических аспектов прорастания пыльцевого зерна, включая гидратацию пыльцевых зерен, активацию ферментных систем, узнавание пыльцы, набухание и прорастание пыльцевых зерен. Особое внимание уделено анализу роли АФК и протеома. Второй разделе обзора литературы целиком посвящен детальному анализу механизмов полярного роста пыльцевой трубки. Обзор показывает высокий уровень компетентности автора в отношении проблем, затронутых в диссертации.

Заслуживает особого внимания методический раздел работы, занимающий почти 20 страниц диссертации. Для выполнения поставленных задач М.А. Брейгина использовала самые современные физиолого-биохимические и биофизические методы исследования: флуоресцентную микроскопию, ЭПР-спектроскопию, электрофорез и зимографию,

спектрофотометрию и спектрофлуориметрию, проточную цитометрию, пэтч-кламп метод, протеомный анализ, электронную микроскопию.

Раздел "Результаты и обсуждение» диссертант разделила на 4 главы, в конце каждой из которых дано обсуждение и формулируются предварительные выводы.

***Релевантность результатов и обоснованность выводов.*** М.А. Брейгиной использовала достаточно широкий спектр современных физико-химических, электрофизиологических и спектральных методов исследования. Разработан оригинальный неинвазивный метод сбора экссудата рыльца, позволивший выявить в нём АФК. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента при уровне значимости 0.05 и 0.01. При обработке пэтч-кламп и ряда других экспериментов данных, где было мало повторностей, использовали статистические критерии для малых выборок (критерии Вилкоксона и Манна-Уитни).

***Значимость работы для науки и практики.*** Механизмы функционирования репродуктивных механизмов – важная проблема для фундаментальной биологии растений. М.А. Брейгиной предложена оригинальная концепция регуляции прорастания пыльцевого зерна с помощью АФК, которая позволяет лучше понять процессы, которые лежат в основе регуляции опыления и оплодотворения. Особое значение имеет обнаружение сходной регуляторной системы у хвойных растений.

Взаимодействия пыльцы и пыльцевых трубок с тканями рыльца и столбика обеспечивают успешное оплодотворение и получение высоких урожаев зерновых и плодовых культур, а также размножение декоративных растений. Особенно остро стоит проблема воспроизводства редких растений со сниженной семенной продуктивностью, в первую очередь, хвойных растений, у которых от опыления до оплодотворения может проходить более года. Поэтому выяснение молекулярных механизмов коммуникации между мужским гаметофитом и женскими тканями спорофита в процессе оплодотворения имеет как фундаментальное, так и прикладное значение.

**Выявленные недостатки.** Несмотря на несомненные достоинства, диссертация М.А. Брейгиной не лишена некоторых недостатков.

1. Известно более десятка сигнальных пептидов (Qu ea, 2015; doi:10.1093/jxb/erv275) и столько же арабиногалактановых белков (Pereira ea., 2016; doi: 10.3389/fpls.2016.01895), которые играют важную роль в регуляции взаимодействия пыльцы и пыльцевых трубок с тканями рыльца и столбика. Однако в диссертации упоминается только один сигнальный пептид RALF. При протеомном анализе начальных этапов прорастания пыльцевых зерен (раздел III.2) роль арабиногалактановых белков не обсуждается совсем.

2. В диссертации написано, что для оценки уровня внутриклеточных АФК диссертант использовала «общепринятый метод окрашивания 50  $\mu\text{M}$  DCFH-DA». Желательно было привести или ссылки на этот метод, или описать его. Аналогичное замечание касается также описания метода конфокальной микроскопии.

3. На стр. 144 диссертант пишет, что «Каналы, через которые осуществляется  $\text{Ca}^{2+}$  ток, по механизму регуляции относятся к потенциалзависимым: они активируются гиперполяризацией мембраны». Непонятно на чем базируется это утверждение. В работе Shang ea (2005), которую цитирует диссертант, говорится о «hyperpolarization-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel», а не о «высокочувствительных к  $\text{La}^{3+}$ , типичных  $\text{Ca}^{2+}$  токах», как сказано в диссертации.

4. Для подтверждения специфичности  $\text{Ca}^{2+}$  токов М.А. Брейгиной использовался  $\text{La}^{3+}$ . Однако известно, что  $\text{La}^{3+}$  является неспецифическим блокатором и может подавлять проводимость не только Са-проницаемых, но также калиевых и анионных каналов (Lewis, Spalding, 1998).

5. Для определения АФК в клетках диссертант использовала флуоресцентный зонд 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин (DCFH), обычно вводимый в форме диацетата (DCFH-DA), который легко проникает в клетки. DCFH окисляется до флуоресцентного продукта 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF) несколькими АФК. При этом необходимо помнить, что этот зонд не

окисляется непосредственно  $H_2O_2$ , а только после того, как  $H_2O_2$  преобразуется в более реакционноспособные соединения с помощью металлов с переменной валентностью или гемовых белков. Кроме того, окисление DCFH и флуоресценция DCF чувствительны к локальным уровням  $O_2$  и pH (Murphy et al., 2022, doi.org/10.1038/s42255-022-00591-z). Поэтому следует интерпретировать полученные результаты с большей осторожностью (см. стр. 144, 166).

6. В диссертационной работе высказывается интересное предположение о том, что функции различных типов АФК ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ) в регуляции прогамной фазы оплодотворения у разных видов растений различаются (стр. 24 автореферата). Желательно бы получить более подробное обоснование этой гипотезы.

7. Результаты, приведенные в таблицах 1, 2 и 4 воспринимаются с трудом из-за нечетких подписей и обозначений.

8. Не расшифрованы аббревиатуры ряда химических соединений, генов и белков, что усложняет анализ работы. Список сокращений отсутствует.

9. В тексте встречаются опечатки и неудачные выражения, например, в разделе 1.5: «для наблюдения и взятия проб на ЖК (или чет такое, ну брали пыльцу после n часов и как-то из нее ЖК тянули) одну точку как контрольную (сухая пыльца) и две временные точки для наблюдения за процессом прорастания пыльцы ели».

Однако указанные замечания не имеют принципиального характера и не снижают научной ценности полученных результатов и выводов. Диссертационная работа М.А. Брейгиной выполнена на высоком методологическом и научном уровне и представляет собой законченное и самостоятельное исследование. Результаты работы апробированы на отечественных и международных научных форумах, а её выводы достоверны и соответствуют поставленным задачам. По материалам диссертации опубликована 24 статьи в журналах из списка ВАК и/или в журналах Web of

Science/Scopus. Диссертационная работа М.А. Брейгиной затрагивает важнейшие аспекты регуляции механизмов взаимодействия пыльцы и пыльцевых трубок с тканями рыльца и столбика и имеет несомненную значимость для современной биологии растений. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

*Общее заключение.* Диссертация М.А. Брейгиной «Активные формы кислорода как регуляторы взаимодействия между мужским гаметофитом и спорофитом семенных растений» отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.21 Физиология и биохимия растений по направлениям исследований: «Онтогенетические программы роста и морфогенеза растений» и «Сигнальные системы клеток и целых растений, рецепция и трансдукция внутренних и внешних сигналов», а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертация оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Брейгина Мария Александровна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности «1.5.21 Физиология и биохимия растений».

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и биохимии растений биологического факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Медведев Сергей Семенович

---

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация: 1.5.21.- физиология и биохимия растений.

Адрес места работы: 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб.,  
д. 7–9

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»,  
биологический факультет, физиологии и биохимии растений

Тел.: ; e-mail: