

ВІДГУК

офіційного опонента Заіменко Н. В. на дисертаційну роботу

Шадріної Руслани Юріївни

«Роль аутофагії у відповіді *Arabidopsis thaliana* на вплив мікрогравітації та участь мікротрубочок в опосередкуванні цього процесу», представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність теми. Дослідження загальних закономірностей метаболізму рослин у модельних експериментах з використанням кліностатів, герметичних камер та в умовах космічного польоту дасть змогу розкрити механізми адаптації різних видів у майбутніх оранжереях на орбітальних станціях, розробити теоретичні передумови космічної біотехнології, створити оптимальні умови для довготривалого перебування людини в замкнутій екосистемі. Найінформативнішими для ідентифікації стану рослин за умов мікрогравітації можуть бути параметри, безпосередньо пов'язані з системою регуляції, насамперед з еколого-фізіологічними і біохімічними процесами, швидкість протікання яких залежить від біологічних особливостей того чи іншого виду та мікроклімату. Як відомо, дослідження реакцій обміну речовин у рослин ґрунтується на визначенні концентрації метаболітів, тому одночасним обліком великої кількості показників можна не лише встановити основні параметри біохімічної системи і передбачити їх перетворення в умовах невагомості, а й окреслити механізми регулювання процесів росту і розвитку рослин для створення керованих екосистем. Наприклад, одночасне дослідження ключових окисно-відновних ферментів у динаміці протягом 10-ти діб дало змогу виявити істотні розходження в активності кожного з них за умов кліностатування. Показано систему ферментативної перебудови у рослин на ранніх етапах розвитку. Так, на 2-гу добу у проростках рослин, наприклад пшениці, підвищувалась активність пероксидази. Для 3-добових проростків характерним було збільшення активності аскорбіноксидази. На 4-ту добу провідну роль у процесі дихання відігравала поліфенолоксидаза. У 5-добових проростків виявлено підвищення активності каталази, у 6- і 7-добових – цитохромоксидази, яка має найбільшу спорідненість до кисню і бере безпосередньо участь не лише в електротранспортному ланцюзі дихання, а й у процесах фотосинтезу. При цьому, виявлено негативний вплив NO на біосинтез фотосинтетичних пігментів, викликаних змінами функціональної ролі світлоіндукованого фактора транскрипції NU5.

Тому, особливої актуальності набувають комплексні роботи, що об'єднують анатоμο-морфологічні, фізіолого-біохімічні та молекулярно-генетичні дослідження, спрямовані на з'ясування ролі аутофагії у формуванні адаптивного потенціалу рослин до умов мікрогравітації. Саме розв'язанню цих важливих завдань присвячено дисертаційне дослідження Шадріної Р. Ю., яке має величезне теоретичне і практичне значення для сучасної біології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у рамках бюджетної тематики відділу клітинної біології та біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»: «Дослідження відповіді рослин на дію абіотичних та біотичних чинників на клітинному та генетичному рівнях для покращення їх адаптивних властивостей до несприятливого впливу змін кліматичних умов» (2017–2021 рр., номер ДР 0117U000909) та проєкту «Розробка концепції регуляції розвитку та стресостійкості рослин для їх адаптації до умов космічних польотів шляхом залучення клітинно-біологічних ресурсів» цільової комплексної програми НАН України з наукових космічних досліджень (2018–2022 рр., номер ДР 01118U003742).

Ступінь обґрунтованості, достовірності наукових положень, висновків, рекомендацій. Для досягнення мети, яка полягає в з'ясуванні участі мікротрубочок у реалізації аутофагії, індукованої мікрогравітацією, та визначенні ролі експресії генів α – і β тубуліну та білка ATG8 у механізмах стійкості до дестабілізаційного впливу кліноостатування, дисертантка розв'язала низку завдань, пов'язаних із оцінюванням закономірностей розвитку процесів аутофагії у клітинах коренів проростків *A. thaliana*, особливостей внутрішньотканинної локалізації NO, просторової організації мікротрубочок.

Наукові положення та висновки, які висвітлено в дисертаційній роботі, ґрунтуються на значному фактичному матеріалі, опрацьованому із застосуванням інформаційно-ресурсних підходів та використанням сучасних методів дослідження.

Результати, отримані Шадріною Р. Ю., суттєво розширюють уявлення щодо ролі мікротрубочок у процесах аутофагії за впливу мікрогравітації та участі оксиду азоту, як сигнальної молекули, в організації структури цитоскелету і забезпеченні адаптації рослин до екстремальних умов. Порівняльний аналіз експресії генів білків ATG8, α - і β -тубуліну при кліноостатуванні дозволив встановити зв'язок між розвитком аутофагії і просторовою організацією мікротрубочок на початкових етапах розвитку рослин *Arabidopsis thaliana*.

Повнота викладення одержаних результатів у наукових працях.

Основні результати дисертаційної роботи Руслани Юрїївни опубліковані в 12 наукових працях, серед яких 3 статті у виданнях, що включені до наукометричних баз даних Scopus та Web of Science. Публікації відображають основні експериментальні дані та їх наукову інтерпретацію, що свідчить про повноту та завершеність представлених результатів.

Повнота викладення наукових результатів дисертації в опублікованих працях відповідає вимогам, що висуваються до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії, та визначені у «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України №44 від 12 січня 2022 року із змінами.

Науково-теоретичне і практичне значення одержаних результатів.

Комплексне дослідження та узагальнення дозволили дисертанці визначити роль аутофагії у відповіді рослин *Arabidopsis thaliana* на вплив мікрогравітації. Вперше проведено аналіз рівнів експресії генів α - і β -тубуліну та білка ATG8 у процесі розвитку стрес-індукованої аутофагії в умовах кліноостатування. З'ясовано роль оксиду азоту у відповіді рослин на вплив імітованої невагомості за участі його донора (SNP), використання якого стимулює зміни росту коренів і призводить до підвищення стійкості рослинних організмів до стресових факторів. Доведено участь мікротрубочок у реалізації аутофагії, що відкриває нові можливості для розуміння клітинних механізмів адаптації рослин.

Важливість поставлених у роботі завдань підтверджується результатами, які дозволили з'ясувати механізми аутофагії та визначити роль адаптації рослин до умов зміненої гравітації. Вивчення закономірностей росту і розвитку вищих рослин в умовах кліноостатування передбачає можливість розкриття механізмів їх самоконтролю і саморегуляції для створення теоретичних передумов космічної біотехнології. Крім того, отримані дані будуть корисними для розуміння основних механізмів адаптації сільськогосподарських культур і підвищення їхньої стійкості до абіотичних стресів.

Оцінка змісту дисертації та її завершеності.

Дисертаційна робота Шадріної Руслани Юрїївни є завершеним науковим дослідженням, яке включає всі необхідні розділи: огляд літератури, матеріали та методи, результати досліджень, узагальнення їх обговорення та висновки. Робота має чітку структуру, логічну послідовність викладення та достатній обсяг

експериментальних даних. Описані експерименти проведені з дотриманням наукових стандартів та етичних норм, що підтверджує достовірність отриманих результатів.

В анотації на 8 сторінках українського та англійського тексту наведено узагальнення наукового пошуку авторки з обраної теми, описано механізми і чинники, які зумовлюють аутофагію в умовах змодельованої мікрогравітації, оцінено роль мікротрубочок у реалізації стрес-індукованої відповіді, визначено вплив NO на ріст і розвиток проростків *Arabidopsis thaliana* за кліностатування; проаналізовано експресію генів α - і β -тубуліну та білка ATG8 під час розвитку аутофагії.

Подано перелік праць дисертантки, опублікованих за темою дисертації.

Вступ. Авторка наводить основні характеристики дисертаційної роботи, чітко окреслює наукові та практичні результати, мету та об'єкт дослідження.

У першому розділі «Фізіологічна роль аутофагії у рослин» детально висвітлено сучасні погляди на фізіологічну роль аутофагії у рослин, проаналізовано молекулярні механізми регуляції аутофагії у відповідності із загальними положеннями теорії стресу та адаптаційного синдрому рослин, систематизовано інформацію щодо основних етапів розвитку аутофагії за дії стрес-факторів різного походження. З урахуванням теорії інваріантності дисертанткою описано процес структуроутворення та визначено основні принципи дисипативної самоорганізації молекулярних структур.

У другому розділі «Роль цитоскелету в процесах розвитку аутофагії» з позиції системології цілеспрямованих систем розкрито структурно-функціональне значення мікротрубочок у формуванні аутофагосом. Проаналізовано існуючу базу знань щодо ролі цитоскелету в розвитку аутофагії в рослинних клітинах та участі NO в модуляції реактивного кисню і ключових регуляторних білків, задіяних в адаптації рослин до мікрогравітації.

Третій розділ носить назву «Аутофагія як адаптивний процес внаслідок дії стресових факторів». Теоретично обґрунтовано роль аутофагії у відповіді на біотичний та абіотичний стрес, яка функціонально задіяна у видаленні пошкоджених білків і клітинних компонентів. Аналіз сучасного стану космічної і гравітаційної фітобіології дозволив авторці досить чітко окреслити основні проблеми з розвитку космічних біотехнологій, вирішення яких спрямовано на глибоке вивчення механізмів впливу гравітації і мікрогравітації на живі системи і створення теоретичних уявлень про ріст і розвиток рослин у штучних екосистемах.

У четвертому розділі «Матеріали та методи дослідження» традиційно надано інформацію щодо умов проведення досліджень, детально описано методологію вирощування рослин в умовах кліноостатування, оцінювання локалізації NO в коренях, дослідження просторової організації мікротрубочок в клітинах. Заслуговує на увагу мультиваріантний підхід при виділенні РНК, проведенні ПЛР у реальному часі та побудові теплових карт експресії за використання Heatmap у програмі TBtools v 1.097188.

П'ятий розділ «Розвиток аутофагії як адаптивної відповіді дослідних рослин на умови змінної гравітації» присвячений дослідженню впливу мікрогравітації на ріст та морфологію коренів проростків *A. thaliana*, аналізу особливостей формування аутофагосом у клітинах. Експериментально доведено наявність відмінностей у сприйнятті різних зон кореня за впливу імітованої мікрогравітації, зокрема найбільш помітний процес аутофагії простежується в клітинах кореневого чохла на 9-ту добу кліноостатування, а в зоні розтягу - на 10-ту добу. Шляхом візуалізації ДНК апоптичних клітин за допомогою пропідію йодиду показано, що з 6-ої по 10-ту добу кліноостатування корені характеризувались високими показниками виживаності. При цьому, відсутність стабільного гравітаційного вектора сприяє хаотичному росту коренів, їхньому закручуванню і зміні напрямку, що призводить до скорочення зон розтягу і перехідної зони кореня та негативно позначається на здатності рослин до поглинання води і поживних речовин. Певна узгодженість простежується і відносно процесів аутофагії, які активуються через 6-9 діб кліноостатування, а через 12 діб вирощування спостерігається зменшення кількості аутофагосом, що свідчить про адаптацію рослин до мікрогравітації.

Шостий розділ «Роль оксиду азоту у відповіді *A. thaliana* на дію мікрогравітації та роль аутофагії в опосередкуванні цього процесу» містить експериментальні дані щодо оцінювання впливу екзогенного донора і скавенджера NO на ріст і розвиток проростків *A. thaliana*, визначення просторового розподілу нітритів у коренях, з'ясування аутофагії у відповідь на дію мікрогравітації за участі оксиду азоту. Встановлено, що за умов кліноостатування простежується позитивний вплив донора NO, який досягав максимальних значень на 8-му добу. За цих умов зафіксовано інтенсивне формування корневих волосків у зоні диференціації. Доволі цікаві результати отримано дисертанткою при визначенні вмісту нітритів у проростках, концентрація яких зростала на 6-ту добу і поступово зменшувалась на 9-ту добу, що свідчить про адаптацію рослин до впливу зміненої гравітації. При дослідженні комбінованої дії кліноостатування та обробки насіння скавенджером

NO (сРТІО) виявлено незначне збільшення аутофагосом. Це може бути пов'язано із порушенням сигнальних шляхів, що залучені до регуляції аутофагії.

Сьомий розділ «Участь мікротрубочок у регуляції процесів аутофагії за умов мікрогравітації» складається з трьох підрозділів, в яких представлено результати дослідження впливу кліноостатування на організацію мікротрубочок у клітинах кореня *Arabidopsis thaliana*, оцінці експресії генів ATG8, α - та β -тубуліну при індукції аутофагії мікрогравітацією. Авторкою висунуто припущення, що мікротрубочки спроможні виконувати функцію гравірецептора клітин, а структурні зміни цитоскелету слугують одним із елементів сприйняття зміненої гравітації. Показано, що на 9-ту добу культивування експресія генів *AtATG8c*, *AtATG8d*, *AtATG8e* рослин несуттєво збільшується, а на 12-ту добу спостерігається різке зниження експресії більшості генів ATG8. Отримана залежність свідчить, що гени *AtATG8* безпосередньо задіяні у розвитку аутофагосом за умов мікрогравітації. Доведено, що зміни в експресії ізотипів генів *AtTUA* можуть бути пов'язані з функціональною участю мікротрубочок у розвитку аутофагії, зокрема на 9-ту добу культивування, коли активність аутофагії була найвищою.

Висновки.

Основні результати дисертаційного дослідження висвітлено в 9 висновках, які відповідають основним завданням роботи та слугують підґрунтям для подальшого розвитку космобіології в контексті еволюції систем життєзабезпечення в умовах космічного польоту. Обґрунтованість висновків не викликає сумнівів, оскільки вони підтверджені статистичним аналізом, отриманих даних. Ілюстрований матеріал відображає результати і аргументовано доводить наміри дисертантки продемонструвати той чи інший висновок.

Зауваження, запитання, побажання, дискусійні питання.

1. Огляд літератури в РОЗДІЛІ 1 є вичерпним і детальним, проте його обсяг є дещо надмірним. Крім того, не достатньо приділено узагальненню та критичному аналізу наведеної інформації.

2. Відомо, що упродовж еволюційного розвитку рослин відбувалися процеси ускладнення та удосконалення їх структурної організації. Адаптацію до умов зовнішнього середовища, в т. ч. мікрогравітації, яке постійно змінювалось, забезпечували не окремі органи, а скоординовані у часі й просторі та підпорядковані між собою функціональні системи. Періодичні процеси, які визначали функціональний принцип побудови живих систем – принцип «стійкої нерівноваги» Бауера відігравали все важливішу роль в еволюції рослинних

організмів, синхронізації й узгодженні в часі різних біохімічних реакцій у клітинах, а також зумовлювали характер взаємодії клітин і формування морфоструктур. Тому з огляду на результати, отримані при комплексному багатофункціональному порівняльному дослідженні процесів аутофагії, доцільно було узгодити дану інформацію з біометричними показниками розвитку рослин, особливо на 6-ту – 12-ту добу вирощування.

3. Потребує відповіді питання: чим пояснюється інтенсивне формування бічних коренів при кліноштатуванні з урахуванням порушень водного забезпечення рослин, що розвиваються за цих умов, і яке, в свою чергу призводить до порушення зв'язку між вуглецевим, фосфорним і азотним обміном та сприяє накопиченню і зміні якісного складу вільних амінокислот? Також необхідно було врахувати і масу коренів, оскільки при фосфатному дефіциті збільшується об'єм кореневої системи.

4. У шостому розділі представлені дані щодо впливу оксиду азоту на процеси аутофагії, проте інтерпретація цих результатів є дещо обмеженою і не включає можливі альтернативні механізми дії NO, зокрема, зменшення вмісту аспарагінової кислоти, що свідчить про порушення азотного обміну, спричинене пригніченням реакцій амінування і переамінування.

5. Дослідження включає моделювання умов мікрогравітації, проте варто було б також розглянути вплив інших факторів космічного простору, таких як радіаційне опромінення, яке є невід'ємною частиною умов космічного польоту.

6. У тексті дисертації місцями зустрічаються повтори і складні для розуміння речення, що може ускладнити сприйняття матеріалу.

Варто зазначити, що ці зауваження не впливають на загальну позитивну оцінку дисертації та наукових доробок здобувачки.

Загальний висновок. Дисертаційна робота Шадріної Руслани Юріївни на тему «Роль аутофагії у відповіді *Arabidopsis thaliana* на вплив мікрогравітації та участь мікротрубочок в опосередкуванні цього процесу» є завершеним, актуальним та самостійним науковим дослідженням, виконаним на високому методичному рівні. Робота характеризується новизною отриманих експериментальних даних, їх достовірністю та обґрунтованістю висновків. За обсягом і рівнем виконаних досліджень, отриманими результатами та оформленням дисертаційна робота заслуговує на позитивну оцінку і відповідає вимогам, передбаченим «Порядком присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженим Постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року із змінами,

внесеними згідно з Постановами КМУ № 341 від 21.03.2022, № 502 від 19.05.2023 р., № 507 від 03.05.2024 р.

Вважаю, що Шадріна Руслана Юріївна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 «Біологія» (галузь знань – 09 «Біологія»).

**Доктор біологічних наук,
член-кореспондент НАН України,
професор, директор Національного
ботанічного саду імені М. М. Гришка
НАН України**



Наталія ЗАІМЕНКО
Наталія ЗАІМЕНКО

Підпис *Наталія Заїменко*
ЗАВІРЯЮ: вчений секретар НБС
ім. М.М. Гришка НАН України
10 «*10*» *09* 2024р.