

## ВІДГУК

офіційного опонента Колупаєва Юрія Євгеновича  
на дисертаційну роботу **ШЕВЧЕНКО Галини Валеріївни**  
**ЦИТОСКЕЛЕТ В ПРОЦЕСІ АДАПТАЦІЇ РОСЛИН ДО**  
**МОДЕЛЬОВАНОЇ МІКРОГРАВІТАЦІЇ ТА ГІПОКСІЇ,**  
представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук  
зі спеціальності 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

*Актуальність дисертаційного дослідження.* Однією з найважливіших і водночас дотепер найменш зрозумілих складових процесу адаптації рослин до стресових чинників є етап рецепції і трансдукції в генетичний апарат стресових сигналів. Він включає в себе сприйняття цих сигналів різноманітними і у багатьох випадках достеменно невідомими сенсорами (рецепторами) і наступну активацію складної сигнальної мережі. Одним із клітинних компонентів, що опосередковує сприйняття сигналів та формування реакції рослин на зовнішні умови, є цитоскелет, репрезентований тубуліновими мікротрубочками й актиновими мікрофіламентами.

Завдяки зв'язкам цитоскелету з плазматичною мембраною та клітинною стінкою формується континуум, який бере участь у сприйнятті та передаванні сигналів. Цитоскелет еволюційно сформувався у полі сталого впливу земного тяжіння і тому виступає індикатором реакції рослинних клітин на зміну полярності та сили тяжіння. Це спонукає до проведення досліджень організації та динаміки його елементів у полі зміненої сили тяжіння – реальної мікрогравітації в космічному польоті та модельованої в наземних експериментах. Проте функціонування асоційованих з цитоскелетом білків, які регулюють з'єднання та функціональну взаємодію його елементів між собою та з плазматичною мембраною залишається малодослідженим. Також мало вивченими залишаються зміни експресії генів, пов'язані з реорганізацією елементів цитоскелету при мікрогравітації.

Крім впливу зміненої сили тяжіння, рослини в космічному польоті зазнають і дії зміненої конвекції повітря, що може призводити до клітинної гіпоксії. Однією з важливих адаптивних змін у відповідь на нестачу кисню є формування аеренхіми у корі коренів. Обов'язковими учасниками цих процесів є елементи цитоскелету. Проте питання щодо послідовності участі та ролі актинових філаментів і

мікротрубочок у формуванні аеренхіми залишаються малодослідженими, особливо в умовах мікрогравітації. Зважаючи на це, проблема участі мікротрубочок та актинових філаментів у реакції клітин коренів на зміну сили тяжіння та гіпоксію є дуже актуальною. На її розв'язання і спрямоване дисертаційне дослідження Г.В. Шевченко.

Мета роботи полягала у визначенні ролі кортикальних мікротрубочок, актинових філаментів та експресії генів асоційованих білків цитоскелету у реакціях клітин коренів рослин на модельовану мікрогравітацію та гіпоксію. Завдання роботи чітко підпорядковані меті і включали, зокрема, дослідження організації елементів кортикального цитоскелету на стадіях диференціації клітин ростових зон коренів; виявлення участі мікротрубочок та актинових філаментів у реакції клітин ростових зон коренів на кліностагування та дію інгібіторів цитоскелету; дослідження взаємозалежності організації мікротрубочок та актинових філаментів у клітинах зони розтягу коренів; визначення експресії генів ряду білків цитоскелету; визначення ролі мікротрубочок та актинових філаментів у формуванні природної та штучно індукованої аеренхіми у коренях різних видів рослин. Важливо відзначити, що для вирішення конкретних завдань дисертантом було вдало підібрано модельні об'єкти, це, зокрема, суходільні та повітряно-водні рослини *Alisma plantago – aquatica*, *Sium latifolium* та *Sium sisaroides*.

**Зв'язок роботи із науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота Г.В. Шевченко виконана у рамках фундаментальних досліджень відділу клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України за держбюджетними темами: «Фенотипічна та генетична пластичність в процесі адаптації рослин до змін навколишнього середовища» (№ ДР0107U000515, 2006-2009 рр.), «Стабільність та пластичність морфогенезу рослин та клітинної організації при змінах водного режиму в природних умовах» (№ ДР0106U000558, 2006-2009 рр.), «Пластичність онтогенезу рослин при змінах водного режиму екотопів: клітинні та молекулярні аспекти» (№ ДР0110U000087, 2010-2014 рр.), «Клітинні та молекулярні механізми адаптації рослин до несприятливих змін екологічних чинників (посуха, затоплення) в природі та експерименті» (№ ДР0112U000059, 2012-2016 рр.), «Дослідження біологічної дії мікрогравітації на мембранному та клітинному рівнях («Біолабораторія-М»), 2012 р., дисертант – керівник і виконавець), а також за грантової підтримки програми з обміну науковими кадрами IRSES 612587 (2013-2017) (FP7, Marie Curie Actions) під час стажування в Університеті міста Геттінген (Німеччина) та Університеті міста

Аберистуїт (Велика Британія).

**Структура та обсяг дисертації.** Робота складається зі вступу, огляду літератури (два розділи), опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень (три розділи), аналізу та узагальнення, висновків, списку використаних джерел і додатків. Список використаних джерел складається з 537 найменувань. Обсяг основного тексту дисертації складає 293 стандартних сторінки.

**Перший розділ** оглядовий і має назву «Структура цитоскелету вищих рослин». У ньому узагальнено сучасні дані про організацію та функціонування мікротрубочок, сигнальні шляхи їх за участю (зокрема, мікротрубочок роль у стресовому сигналінгу та зв'язок з гормональним сигналінгом), також викладено уявлення про організацію та функціонування актинових філаментів, в окремому підрозділі наведено відомості про регуляцію організації мікротрубочок та актинових філаментів асоційованими білками цитоскелету, також розглянуто взаємозалежне функціонування елементів цитоскелету у реакціях на дію стресових чинників.

**Другий розділ** дисертації «Реакції цитоскелету рослин на модельовану мікрогравітацію та гіпоксію» також оглядовий. У ньому описано методи моделювання умов космічного польоту на Землі, проаналізовано перебудови мікротрубочок та актинових філаментів в умовах реальної мікрогравітації та кліноостатування. В окремому підрозділі узагальнено дані про реакції цитоскелету рослин на гіпоксію, у тому числі за умов космічного польоту; наводяться відомості щодо участі цитоскелету у формуванні аеренхіми коренів вищих рослин. Також розглядаються питання участі цитоскелету у процесах старіння клітин рослин, які супроводжуються апоптозоподібними реакціями.

**У розділі 3** описано матеріали і методи досліджень. Зокрема, на початку розділу наведено перелік лабораторних, культурних і дикорослих рослин, що використовувалися як експериментальні об'єкти і вказано походження кожного об'єкта. Детально описано організацію експериментів з використанням кліноостатів для моделювання умов зміненої сили тяжіння, при цьому акцентовано увагу на можливих недоліках методики та способах їх уникнення. В окремому підрозділі обґрунтовано використання інгібіторів тубуліну і актину з урахуванням особливостей дії конкретних сполук. Також детально з необхідною візуалізацією описаний дизайн експериментів з вивчення ефектів мікрогравітації на компоненти цитоскелету. Описано протоколи методів імуноцитохімії та світлової мікроскопії

при дослідженні структури мікротрубочок та актинових філаментів, а також методів конфокальної та електронної мікроскопії для дослідження ультраструктури. Детально описано і методологію дослідження експресії генів методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Також наведено опис аналізу ступеня пошкодження геномної ДНК, оцінки пероксидного окиснення ліпідів мембран. Наприкінці розділу наведено необхідні дані про повторення експериментів і методи статистичної обробки результатів.

**У розділі 4** представлено експериментальні дані автора стосовно впливу кліноостатування на організацію цитоскелету на послідовних стадіях диференціації клітин коренів *Zea mays* та *Beta vulgaris*. Зокрема, наведено власні дані, що характеризують кортикальні мікротрубочки у клітинах меристеми та зони розтягу коренів, охарактеризовано вплив кліноостатування на мікротрубочки клітин дистальної зони розтягу, описано організацію актинових філаментів у меристемі та дистальній зоні розтягу кореня. Автором зроблено висновок, що мережа вперше описаних актинових філаментів у *B. vulgaris* подібна до такої у *Z. mays*. Відзначено протилежний вплив на ріст коренів самого лише кліноостатування (підсилення у *Z. mays* і пригнічення у *B. vulgaris*) та сумісної дії кліноостатування й інгібіторів цитоскелету таксолу/цитохалазину D (пригнічення у *Z. mays* та посилення у *B. vulgaris*). Це, на думку автора, може означати активацію специфічного механізму стабілізації росту коренів при змінній силі тяжіння, спрямованого на забезпечення життєдіяльності коренів за стресових умов. Результати розділу опубліковані автором у шести статтях (більшість у журналах, що індексуються в Scopus) та у форматі глави в колективній монографії, виданій корпорацією Springer.

**Розділ 5** має назву «Взаємозалежна організація мікротрубочок і актинових філаментів у зоні розтягу коренів *Arabidopsis thaliana*». У ньому, зокрема, наведено експериментальні дані з організації кортикальних мікротрубочок і актинових філаментів зони розтягу коренів *A. thaliana* після впливу оризаліну, цитохалазину D та кліноостатування. В окремому підрозділі представлено отримані автором дані про експресію генів, білки яких регулюють організацію цитоскелету коренів *Arabidopsis thaliana* в умовах кліноостатування, зокрема, *TUA6*, *ACT2*, *MAP65-1*, *CLASP*, *PLDd*, *FH1* та *FH4*. Наводяться також дані стосовно організації мікротрубочок, актинових філаментів та експресії *TUA6* і *ACT2* за дії кліноостатування, оризаліну та цитохалазину. На підставі результатів власних експериментів із застосуванням інгібіторів актину і тубуліну автор робить

висновок про перехресну взаємодію елементів цитоскелету, зокрема про взаємозалежність організації актинових філаментів та експресії гена *TUA6*, а також здатність пулу мономерного актину зворотно регулювати експресію *TUA6*.

Окремий підрозділ присвячено аналізу експресії генів *MAP65-1*, *CLASP* та *PLDd* за дії кліноостатування й оризаліну та цитохалазину. Дисертантка робить висновок щодо регулювання експресії *MAP65-1* актиновим цитоскелетом, а саме, зворотну залежність між пулом вільних мономерів актину та експресією *MAP65-1*. Це перше спостереження зв'язку між організацією актинових філаментів та експресією *MAP65-1*, який кодує асоційований з тубуліном білок. Також дослідження автора показали, що кліноостатування знижує експресію гена *CLASP*. Це відбувається на фоні безпосереднього впливу кліноостатування на експресію гена *TUA6*. Автор припускає, що між цими дома процесами є певний взаємозв'язок.

У роботі досліджено і експресію формінів *FH1* та *FH4* за дії кліноостатування, оризаліну та цитохалазину. Отримані результати показали регулювання експресії цих генів за рахунок організації актинових філаментів та здатність зниженого рівня гравітаційного навантаження впливати на таке регулювання. Автором виявлено зворотний зв'язок між організацією актинових філаментів та рівнем експресії *FH1/FH4*. Також отримано дані про вплив організації кортикальних мікротрубочок на експресію гена *CLASP*. В цілому отримані дані свідчать, що взаємодія актинових філаментів і мікротрубочок у кортикальній області забезпечує ростові та сигнальні процеси клітини. Результати розділу оприлюднено у 15 статтях, шість з яких у журналах Q1 і Q2, а також у двох розділах монографій.

**Розділ 6** присвячено аналізу результатів дослідження організації елементів цитоскелету у коренях рослин за умов гіпоксії. У першій його частині автор розглядає власні дані з будови аеренхіми у коренях повітряно-водних рослин *Alisma plantago – aquatica* та *Sium latifolium*. У наступній наводяться власні результати досліджень організації мікротрубочок у клітинах коренів цих видів при формуванні аеренхіми. Варто відзначити, що авторка обрала цікавий спосіб штучного індукування утворення аеренхіми у *Z. mays*: шляхом вирощування рослин на середовищі зі зниженим вмістом сірки. Отримані результати засвідчили, що у процесі як природного, так і штучного утворення аеренхіми кортикальні та ендоплазматичні мікротрубочки беруть участь у різних за часом етапах загибелі клітин. Кортикальні мікротрубочки першими зазнають дезорганізації, оскільки

зменшення щільності клітинних стінок і відокремлення мікротрубочок від цитоплазматичної мембрани відбувається ще за функціонування екзоцитозної сітки мікротрубочок та актинових філаментів, яка забезпечує потрапляння ферментів лізису на мембрану та руйнування компонентів клітинної стінки.

Один із підрозділів містить дані про організацію актинових філаментів у клітинах коренів повітряно-водних рослин *A. plantago – aquatica* та *S. latifolium*. Встановлено, що мережа актинових філаментів у клітинах рядів кори коренів *A. plantago – aquatica* не зазнає істотного руйнування, водночас у клітинах кореня *S. latifolium* актинові філаменти поступово руйнуються. Збереження їх організації до кінцевих етапів руйнування клітин дозволяє цитоскелету забезпечувати клітинний метаболізм та екзоцитоз і таким чином підтримувати функції коренів. Досліджено також процеси пероксидного окиснення ліпідів, які можуть бути причетні до реорганізації актинових філаментів. Водночас автором встановлено, що у наземного представника *Sium – S. sisaroides* вміст малонового діальдегіду на порядок вищий, ніж у повітряно-водних рослин *S. latifolium*. У рослин *A. plantago-aquatica* також виявлене збільшення окиснених продуктів ліпідів мембран саме у наземної форми. На думку автора, знижений рівень ПОЛ у повітряно-водних *A. Plantago – aquatica* та *S. latifolium* може бути пов'язаний з тим, що динамічні інтактні актинові філаменти залучені до внутрішньоклітинних метаболічних процесів, включаючи як етапи програмованої клітинної загибелі, так і екзоцитоз. Дисертант зазначає, що порівняно із наземними формами для повітряно-водних форм *S. latifolium* на фоні меншого рівня ПОЛ була характерною динамічніша мережа актинових філаментів, яка, ймовірно, необхідна для екзоцитозу у процесі формування аеренхіми лізигенного типу. Динамічні актинові філаменти у коренях повітряно-водних рослин – одна із необхідних складових розвитку аеренхіми. За результатами досліджень формування аеренхіми дисертанткою опубліковано 6 статей, дві з яких у журналах рівня Q1.

**Заключний (сьомий) розділ** містить глибокий аналіз та узагальнення результатів дисертаційного дослідження. Аналізуючи реакцію цитоскелету на модельовану мікрогравітацію і гіпоксію, автор робить висновок, що спільним у реакції цитоскелету коренів на обидва ці фактори є перебудови кортикальних мікротрубочок. Як у разі кліностагування, так і утворення схизогенної та первинних етапів лізигенної аеренхіми у клітинах коренів порушується організація кортикальних мікротрубочок, відбувається їх розшарування та відхилення від поперечної орієнтації. Це, у свою чергу, позначається на пом'якшенні клітинних

стінок і змінах темпів росту коренів та/або відокремленні клітинних рядів внаслідок послаблення міжклітинних з'єднань. Цей процес регулюється динамікою мікротрубочок (полімеризацією/деполімеризацією). Також у дисертації наголошується, що наявність сумісної організації мікротрубочок і актинових філаментів підтверджується не тільки руйнуванням мережі актинових філаментів інгібітором полімеризації мікротрубочок, а руйнування мікротрубочок – інгібітором полімеризації актинових філаментів, а й даними щодо транскрипційної регуляції експресії генів *TUA6* та *ACT2* організацією мікротрубочок та актинових філаментів у *A. thaliana*. Таким чином, встановлено зв'язок між організацією мікротрубочок та актинових філаментів і транскрипційною регуляцією їхніх генів.

Примітно, що розділ закінчується цілком конкретним окресленням перспектив розвитку розпочатих досліджень адаптації цитоскелету до механічного стресу та гіпоксії. Серед них вивчення регуляції динаміки мікротрубочок і актинових філаментів численними асоційованими білками; дослідження транскрипційної регуляції структурних генів цитоскелету та асоційованих білків, які забезпечують динамічне функціонування континууму клітинна стінка — цитоплазматична мембрана – цитоскелет; з'ясування сигналіngu за участю цитоскелету при реакції на механічний стрес та гіпоксію та інші чинники.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Дисертанткою вперше досліджені кортикальні мікротрубочки і актинові філаменти на послідовних стадіях розвитку клітин коренів у *B. vulgaris*, *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium* і визначена подібність організації елементів цитоскелету у клітинах ростових зон коренів вищих рослин. Оцінений вплив кліноостатування на організацію мікротрубочок у ростових зонах коренів *B. vulgaris*, *Z. mays* та *A. thaliana*. Також вперше встановлено, що кліноостатування сприяє частковій дезорієнтації кортикальних мікротрубочок, що може бути складовою зміни темпів росту коренів. Дезорганізація мікротрубочок при кліноостатуванні може бути зумовлена зниженою експресією генів, які кодують мономери тубуліну (*TUA6*) та білок *CLASP* (*CLASP*). Це може порушувати полімеризацію мікротрубочок та спричиняти дезорганізацію їх мережі. Автором запропонована схема реакції цитоскелету на кліноостатування і його участі у формуванні адаптаційної відповіді.

Іншою важливою і новою складовою отриманих результатів є дані про механізми формування аеренхіми у відповідь на гіпоксію. Автором визначена специфічність формування аеренхіми лізигенного типу у повітряно-водної рослини *S. latifolium* та встановлені етапи програмованої клітинної загибелі за

участю кортикальних мікротрубочок під час формування аеренхіми коренів *A. Plantago — aquatica*, *S. latifolium* та *Z. mays*. Отримані результати вказують на функціональні зміни мережі актинових філаментів в процесі розвитку аеренхіми коренів. Також автором виявлені відмінності та подібності залучення елементів цитоскелету до реакцій на модельовану мікрогравітацію та гіпоксію. Загалом робота репрезентує цілісні уявлення щодо організації та функціонування елементів цитоскелету у коренях рослин в змінених умовах сили тяжіння та за впливу гіпоксії.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати роботи суттєво розширюють уявлення про реакцію рослин на механічне навантаження та нестачу кисню, що є вагомим внеском у космічне рослинництво, оскільки дає теоретичне підґрунтя для створення умов вирощування рослин під час довготривалих пілотованих місій. Крім того, дані щодо реакції цитоскелету на навколишні стимули можуть бути цінними для біотехнології сільськогосподарських культур при розв'язанні проблеми вилягання рослин в польових умовах, а також їх адаптації до гіпоксії, що виникає при затопленні посівів або утворенні льодяних корок на посівах озимих у зимовий період.

**Ступінь обґрунтованості і вірогідності наукових досліджень та висновків дисертаційної роботи.** Дисертаційна робота Г.В. Шевченко є цілісним завершеним науковим дослідженням, виконаним на високому методичному рівні. Висновки і положення, наведені у роботі, підтверджуються великим масивом експериментальних даних, їх статистичним та логічним аналізом. Дисертанткою використаний широкий арсенал сучасних методів клітинної біології: світлова, електронна та конфокальна мікроскопія, класичні цитологічні та імуногістохімічні методи, прижиттєве спостереження за станом об'єктів за допомогою конфокальної мікроскопії. Також у роботі застосовувалися молекулярно-генетичні методи, зокрема, полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі (qPCR) та біоінформатичні (робота з протеомними та генними базами даних).

**Повнота викладення результатів та апробація дисертації в опублікованих працях.** Результати роботи опубліковано у 53 наукових працях, з них 24 статті у фахових виданнях (серед яких переважна більшість у журналах, що індексуються в базах Scopus та WoS, зокрема, 13 статей у журналах рівня Q1-Q3), 2 розділи у англомовних монографіях та 27 тез доповідей на міжнародних конференціях (у Німеччині, США, Бельгії, Італії, Іспанії та інших країнах), а також на вітчизняних форумах і з'їздах Українського товариства клітинної біології.



**Автореферат дисертації** відображає основний зміст роботи і не містить положень, які не входять до дисертації.

**Запитання і зауваження.** В цілому матеріали дисертації викладено логічно, послідовно і з необхідним ступенем деталізації. Разом з тим варто звернути увагу на окремі недоліки.

1. В оглядовому розділі (с. 44) автор описує різні посттрансляційні модифікації тубулінів, але при цьому чомусь не згадує модифікації оксидом азоту, які в останнє десятиліття досліджувалися не тільки зарубіжними, а й вітчизняними вченими.

2. В огляді наводяться ілюстративні фото (напр., рис. 1.3, 1.4), судячи з усього, вони є авторськими, але це не зазначено у підписах до рисунків.

3. Оглядова частина роботи представлена в двох окремих розділах. Проте у першому з них «Структура цитоскелету вищих рослин» немає жодних підсумків, а у другому - «Реакції цитоскелету рослин на модельовану мікрогравітацію та гіпоксію» підсумковий абзац є, проте було б краще, якби після всієї оглядової частини були б наведені підсумки із зазначенням невирішених питань, які стосуються тематики дисертаційного дослідження.

4. Переважна більшість методів досліджень і методичних прийомів описана автором детально. Проте опис методів визначення пероксидного окиснення ліпідів (здатних реагувати з 2-тіобарбітуровою кислотою) потребує уточнення. Автор посилається на методику, викладену у роботі [Dhindsa R. S., & Matowe W. (1981). Drought Tolerance in Two Mosses: Correlated with Enzymatic Defence Against Lipid Peroxidation. *Journal of Experimental Botany*, 32(1), 79–91.]. Однак описи, наведені у дисертації і вказаній статті, істотно відрізняються. У статті Dhindsa and Matowe йдеться про використання 0,25% 2-ТБК в 20% ТХО, визначення специфічної абсорбції продуктів реакції при 532 нм і неспецифічного поглинання при 600 нм, що відповідає описам подібної методики у багатьох авторів (вона по суті класична). Проте в дисертації зазначається, що матеріал «гомогенізували в 5 мл 0,1%–ої трихлороцтової кислоти і в 1 мл 0,5 %–ої тіобарбітурової кислоти» (с. 99). Постає питання, чи достатня 0,1% концентрація ТХО для осадження білків і забезпечення відповідного середовища. Також автор пише, що «Верхню фазу [супернатант?] фотометрували у довжинах хвилі 535–570 нм», при цьому залишається незрозумілим, як розраховували результати і на який саме продукт. Також неясно, чи враховували неспецифічне поглинання при 600 нм, яке зазвичай віднімають від основного результату.

В продовження зауваження стосовно аналізу продуктів пероксидного окиснення ліпідів: похибки величин вмісту ТБК-активних продуктів занадто великі, в окремих випадках до 30% від вимірюваної величини. При цьому у табл. 6.3 не вказано, між якими величинами відмінності вірогідні.

5. Трапляються огріхи на окремих рисунках, наприклад, у підпису до рис. 5.5 зазначається, що «зірочками позначені точкові угруповання актину», але такі позначення не помітні. Містяться і редакційні огріхи на кшталт «діяльність НАДФН-оксидази (с. 197), «послідуюче попадання» (с. 248) та інші.

Проте перелічені зауваження жодним чином не знижують загальну високу позитивну оцінку роботи.

**Висновок.** Дисертаційна робота Шевченко Галини Валеріївни є завершеною науковою працею, яка за актуальністю, обсягом, обґрунтованістю положень і висновків, науковою новизною і практичним значенням, повнотою викладення матеріалу в опублікованих працях та іншими критеріями відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертацій» та вимогам Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук, затвердженого Постановою Кабінету міністрів України від 17 листопада 2021 року №1197, а її автор Шевченко Галина Валеріївна, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук зі спеціальності 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія.

Офіційний опонент  
доктор біол. наук, професор,  
зав. лабораторії фізіології та біохімії  
рослин Інституту рослинництва імені  
В.Я. Юрева НААН України



Ю.Є. Колупаєв

Підпис Колупаєва Ю.Є. засвідчую:  
учений секретар Інституту рослинництва імені  
В.Я. Юрева НААН України, доктор с.-г. наук



Н.І. Васько

15.02.2024