

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу Нестеренко Олени Геннадіївни «Модифікація радіобіологічних реакцій рослин гороху (*Pisum sativum* L.) абіотичними стресорами», яка представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) зі спеціальності “03.00.01 – радіобіологія”.

Актуальність обраної теми. В природних умовах живі організми зазнають поєднаного впливу багатьох негативних чинників, серед яких наслідки антропогенної діяльності та кліматичних змін набувають особливої небезпеки. Глобальний характер радіаційного забруднення довкілля визначає важливість досліджень взаємодії іонізуючої радіації з найпоширенішими стресовими абіотичними факторами для вищих рослин, такими як засолення ґрунтів та гіпертермія. Окремий вплив кожного із зазначених стресорів на сьогодні активно вивчається, проте їхня поєднана дія, яка спостерігається в природних умовах, може мати неочікувані наслідки для розвитку, адаптації, зміни біологічних властивостей та продуктивності рослин. Адитивність та синергізм – найпоширеніші типи поєднаної взаємодії пошкоджуючих агентів на організм, проте існуюча концепція та модель синергізму не дозволяє коректно оцінювати та прогнозувати біологічні ефекти комбінованої дії радіації в малих дозах з іншими абіотичними факторами довкілля.

В цьому аспекті актуальність дисертаційної роботи Нестеренко О.Г., присвяченої пошуку «перехресної» взаємодії різних сигнальних шляхів пристосування рослин на комбіновану дію іонізуючої радіації в малих дозах з осмотичним або гіпертермічним шоком, не викликає сумнівів.

Для визначення характеру взаємодії зазначених чинників дисертантка обрала системний підхід на основі аналізу комплексу показників стрес-реакції проростків гороху посівного на різних рівнях структурно-функціональної організації з використанням сучасних молекулярно-генетичних методів та протеомного аналізу, що має важливе теоретичне та науково-практичне значення.

На особливу увагу заслуговують дослідження дисертантки щодо маркерів індукції адаптаційних реакцій у рослин в стресових умовах, таких як вміст та динаміка коливань вільного проліну, індукція ретротранспозонів з довгими кінцевими повторами (LTR-транспозонів), які у посівного гороху займають близько 30% геному, зміни структури, конформації та експресії індукованих білків.

Для досягнення поставленої мети дисертантка поставила конкретні завдання, після вирішення яких вдалося отримати дані, що відрізняються принциповою новизною та розширюють сучасні напрямки досліджень в галузі радіобіології, генетики, протеоміки.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась з 2009 по 2019 роки у відділі біофізики і радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України під керівництвом д.б.н. Рашидова Н.М. в рамках 4-х бюджетних тем, а також в рамках міжнародного обміну за проектом European Commission FP7-PEOPLE-2013-IRSES- Marie Curie Action "International Research Staff Exchange Scheme".

Повнота викладу основних наукових положень та висновків у опублікованих наукових працях. Результати дисертаційної роботи повно висвітлено у 16 наукових працях, серед яких 2 статті у міжнародних часописах та 4 статті у періодичних фахових виданнях України, розділ у монографії та 9 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій.

Наукова новизна одержаних результатів та їх практична значимість. Наукова новизна дисертаційної роботи полягає, насамперед, у системному підході до вивчення реакцій на комбіновані пошкоджуючі абіотичні впливи на вищі рослини. Вперше визначено, що переважний характер взаємодії радіації та досліджуваних абіотичних стресорів, визначений за змінами протеому, є кооперативна антагоністична взаємодія, що дисертант пов'язує з появою перехресної взаємодії в сигнальних шляхах, індукованих дією стресорів. Показано що попереднє опромінення проростків гороху у діапазоні середніх доз

може тимчасово посилювати відновлення саджанців після осмотичного або термічного стресу.

Дисертантом досліджено та отримано нові дані про поєднаний вплив різних видів стресу на активність мобільних генетичних елементів рослин, зокрема на активність LTR-ретротранспозонів, які поглиблюють знання щодо їх ролі у забезпеченні генетичної пластичності рослин у відповідь на дію абіотичних факторів.

За допомогою сучасних методів протеомного та біостатичного аналізу вперше визначено та охарактеризовано каскад білків, що індукуються дією на проростки гороху іонізуючим випромінюванням в малих дозах у поєднанні із сольовим шоком.

Одержані результати можуть бути рекомендовані для використання у радіобіологічних дослідженнях, аналізі мобільних генетичних елементів, протеомних змін з метою розробки чутливих та інформаційних методів оцінки та прогнозування адаптаційного потенціалу рослин.

Обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих в дисертації, їх достовірність. Основні наукові положення та висновки, сформульовані Нестеренко О.Г., є достатньо обґрунтованими внаслідок застосування адекватних та сучасних методів дослідження, великого обсягу одержаного фактичного матеріалу та відповідних методів статистичної обробки даних.

Загальна оцінка змісту дисертації та її оформлення. Кваліфікаційна робота Нестеренко О.Г. відповідає «Вимогам до оформлення дисертації, затверджених Наказом МОН України № 40 від 12.01.2017 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», містить анотацію українською та англійською мовами, вступ й основну частину (розділи: «Огляд літератури», «матеріали та методи досліджень», «результати досліджень та їх обговорення», «узагальнення»), висновки, список використаних джерел, що налічує 183 посилання. Дисертація містить 21 рисунок та 9 таблиць. Обсяг роботи складає 157 сторінок друкованого тексту.

У *вступі* обґрунтовано актуальність проблеми, сформульовано мету, завдання роботи, коротко висвітлено новизну та практичне значення результатів, наведено відомості про апробацію роботи.

У *розділі 1* представлено короткий огляд негативних абіотичних факторів на рослинні організми, актуальних для сучасної екологічної ситуації в Україні: іонізуючої радіації, засолення ґрунтів, підвищеної температури та особливості формування стресових реакцій на різних структурно-функціональних рівнях організації рослин. В окремих підрозділах розглянуто дані наукових джерел про роль різних маркерів морфологічних, метаболічних (амінокислоти проліну), генетичних (активність LTR-вмісних ретротранспозонів) та протеомічних змін у формуванні стресової реакції рослинного організму на дію зазначених абіотичних чинників.

У *розділі 2* “Матеріали та методи дослідження”, відповідно до мети та завдання роботи, представлено характеристику 15-ти дослідних груп, умови опромінення, проведення процедур осмотичного та теплового шоку. Слід відмітити чіткий та детальний опис методів аналізу транспозиції LTR-ретротранспозонів (підрозділ 2.7), а також аналіз протеому проростків гороху після комбінованої дії іонізуючого опромінення та засолення (підрозділ 2.8).

Дисертантом одержано великий обсяг експериментальних даних, які представлено у *розділі 3* та його окремих підрозділах.

Розділ 3.1 містить оцінку морфометричних показників гороху посівного після комбінованої послідовної дії іонізуючої випромінювання із осмотичним та тепловим шоком на різних фазах стресової відповіді. Показано відхилення від адитивних ефектів комбінованої дії в бік синергізму або антагонізму, що найбільш яскраво спостерігається через дві та вісім діб після дії стресорів, коли попереднє опромінення призводило до посилення швидкості росту, а також на тимчасовий характер цього явища.

У *розділі 3.2* дисертантка наводить результати аналізу різних типів порушень та аномалій у будові проростків гороху посівного за окремої та комбінованої дії зазначених стресових агентів. У зв'язку з одержаними

показниками, в наступному *розділі 3.2* детально обговорюється та досліджується роль проліну як одного з найбільш багатофункціональних стресових метаболітів рослин, зокрема його участі у формуванні реакції на послідовний сольовий та тепловий стрес, радіаційну дію у комбінації з ними, а також визначенню кореляційних зв'язків між вмістом проліну та оводненістю коренів в умовах експерименту. Дисертантка робить справедливий висновок про неоднозначність одержаних даних щодо накопичення проліну при комбінованій дії різних стресорів та припускає утворення на певних етапах відповіді рослин факторів, що здатні впливати на систему синтезу амінокислоти, її деградацію, модифікацію відповідних сигнальних шляхів, індукованих стресорами.

Зважаючи на надзвичайно важливу роль транспозиції МГЕ у процесах еволюції та перебудови ДНК рослин, генетичної пластичності, пов'язаної з механізмами адаптації рослинного організму до негативних змін довкілля, слід відмітити *розділ 3.4*, в якому представлено дослідження продуктів ампліфікації відповідних праймерів до LTR-вмісних ретротранспозонів, активованих внаслідок дії комбінованого стресу на різних фазах онтогенезу гороху та динаміку їх змін після стресової дії. Відповідно до літературних даних, для аналізу індукованих МГЕ дисертантка обрала 7 універсальних та 3 специфічні праймери для аналізу іPBS ампліфікації та поліморфізму ампліфікованих ділянок ДНК між двома сусідніми ретротранспозонами (IRAP), відповідно.

За результатами ампліфікації та аналізу електрофоретичних спектрів були відібрані найбільш інформативні праймери іPBS2074 та CYCLOP. Найвища активація транспозиції ретротранспозонів виявилась за дії радіації у високих та низьких дозах за самотійної дії та у поєднанні із сольовим стресом, а також за дії сольового та теплового шоку.

Дослідження глобальних змін у складі та вмісті білків у проростків *P. sativum L.* за дії іонізуючого випромінювання у поєднанні з наступним впливом осмотичного стресу представлено дисертантом у *розділі 3.5*.

Використовуючи двомірний гель-електрофорез, а також сучасні методи біоінформатики дисертанту вдалося виявити 223 білків, з яких 54 зразки

статистично вірогідно відрізнялися від контролю за вмістом, а також ідентифікувати 39 з них. Показано, що найбільшої модифікації зазнали білки у відповідь на поєднаний вплив іонізуючої радіації та засолення. Відповідно до індукованих змін вмісту білків дисертант визначила основні типи взаємодії стресових факторів. Показано, що для 63% виявлених змін протеому формувались за типом кооперативного антагонізму.

У *розділі «Узагальнення»* дисертант розкриває основний зміст та результати роботи, з яких логічно сформульовано висновки.

Зауваження щодо змісту і оформлення роботи

Принципових зауважень до наукової частини роботи немає.

Позитивно оцінюючи дисертаційну роботу, вважаю за необхідне викласти наступні зауваження та побажання, зумовлені, насамперед, недостатньою вичиткою тексту дисертації:

1. В роботі часто зустрічаються описки, русизми, термінологія російською мовою, деякі граматичні та стилістичні помилки, як то: «отжиг», замість відпалу (с.53, 54); «екстримальна» температура (с. 13, Зміст); «Вена» замість Відню (с. 48); було обрано «7 штук» праймерів (с.52); «бичачий альбумін сироватки» замість альбумін з бичачої сироватки; у підписах до рисунків та тексті часто зустрічається «вплив різних доз іонізуючого опромінення в діапазоні...» замість впливу іонізуючого випромінювання у різних дозах; підвищення мобільності мобільних генетичних елементів тощо.
2. Зауваження до розділу «Матеріали і методи».
 - В таблиці 1 (схемі експерименту) позначення для 15 (!) експериментальних груп та відповідних стресових факторів у повернутому на 90° вигляді утруднює її сприйняття (с. 47).
 - В умовах опромінення зайве вказувати тривалість опромінення, якщо відома доза та її потужність.
 - Назву рангового дисперсійного аналізу не слід скорочувати до «Кр.-Волеса», а писати повністю – Краскела-Уолеса (або Крускала-Воліса).

- У розділі матеріалів і методів наведено незрозуміле речення: «Статистичну обробку даних здійснювали на рівні $p < 5\%$ достовірності....». Очевидно, автор мала на увазі, що достовірність різниці між одержаними даними оцінювали при рівні статистичної значущості $p < 0.005$? При цьому на жодному рисунку достовірна різниця у показниках не вказана.
 - У підрозділі 2.4 «Статистична обробка даних» необхідно вказати не лише програмні продукти, за допомогою яких здійснювався аналіз даних, а й перелік статистичних підходів, методів, тестів/критеріїв, обраних рівнів значущості тощо.
 - Підпункт 2.6. розділу називається «Кореляція концентрації проліну з вмістом води у коренях рослин», проте не містить жодних відомостей про методи кореляційного аналізу даних.
3. Нажаль, представлені в авторефераті та дисертації загальні діаграми відповіді усіх дослідних груп (15!) в динаміці експерименту (рис. 2, 3 та 10, 14, відповідно), сприймається дуже важко.
 4. У висновку вказано 4, що найбільш активну появу ампліконів LTR-транспозонів визначено за дії радіації у найменшій та найвищій дозах (5 та 25 Гр, відповідно). Чим можна пояснити відсутність такої реакції за дії радіації в дозі 10 та 15Гр?
 5. Висновок 5 дещо незрозуміло сформульовано: йдеться про «вперше» показану автором зміну концентрації більшості визначених білків у відповідь на комбінований вплив радіації та засолення. Насправді дисертант вперше виявив, що за комбінованої дії зазначених чинників концентрація визначених білків була найвищою.

Проте зауваження та побажання мають формальний характер, не ставлять під сумнів суть, результати та висновки роботи.

Даючи оцінку дисертаційної роботи Нестеренко О.Г. у цілому, слід зазначити, що вона є завершеною кваліфікаційною роботою, яка у повній мірі містить вирішення поставлених завдань із застосуванням сучасних та

адекватних методів досліджень. Зміст автореферату відображає зміст, результати та висновки дисертаційної роботи.

Таким чином, дисертаційна робота Нестеренко О.Г. «Модифікація радіобіологічних реакцій рослин гороху (*Pisum sativum* L.) абіотичними стресорами» за обсягом, актуальністю, методичним рівнем та науковою значимістю повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів» Постанови Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами та доповненнями) щодо кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.01 – радіобіологія.

Офіційний опонент:

с.н.с. відділу радіобіології
та радіоекології
Інституту ядерних досліджень
НАН України
кандидат біол. наук,
старший дослідник



Рябченко Н.М.

Підпис Рябченко Н.М.
Засвідчую
Вчений секретар ІЯД НАНУ



Дорошко Н.Л.

