

До разової спеціалізованої вченої ради ID 4997
Інституту клітинної біології та генетичної інженерії
вул. Академіка Заболотного, 148, м. Київ, 03143

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, доцента, професора кафедри
ботаніки, дендрології та лісової селекції Національного університету
біоресурсів і природокористування України
Ліханова Артура Федоровича

на дисертаційну роботу Богданович Таїси Андріївни
«Розробка біотехнології отримання сполук з протизапальними та
антиоксидантними властивостями з «бородатих» коренів *Artemisia tilesii*
Ledeb.», подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії
з галузі знань 09 «Біологія»
за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність теми дисертаційної роботи.

Актуальність теми дисертаційної роботи Богданович Т.А. сумнівів і заперечень не викликає. Розробка методів контрольованого синтезу біологічно активних речовин є одним з пріоритетних напрямків розвитку сучасних біотехнологій у країнах з розвиненою економікою. Враховуючі унікальний склад вторинних метаболітів, які синтезуються і накопичуються в тканинах вегетативних органів *Artemisia tilesii*, отримання рослин з високою продуктивністю в найближчій перспективі дозволить забезпечувати попит суспільства на продукти рослинного походження, які здатні проводити профілактичні заходи, покращувати стан здоров'я і якість життя.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота є результатом багаторічних наукових досліджень, які виконувались в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН за бюджетними темами: «Синтез рекомбінантних фармацевтичних білків та підвищення вмісту біологічно активних природних сполук в рослинах» (реєстраційний номер: 0123U101081), «Індуковані зміни спектра біологічно активних сполук та накопичення білків генно-інженерного

походження в рослинах» (реєстраційний номер: 0122U001510) та «Цілеспрямовані зміни геному та плейотропні ефекти у генетично трансформованих рослинних системах» (реєстраційний номер: 0120U100849).

Наукова новизна одержаних результатів.

Комплексні дослідження дозволили дисертанту здійснити генетичну трансформацію і отримати 15 ліній рослин *A. tilesii* з ефектом формування «бородатих» коренів, провести комплексний аналіз специфіки їх росту, визначити антиоксидантну та відновлювальну активності вторинних метаболітів. Автором проведено порівняльний аналіз вмісту фенолкарбонових кислот у тканинах «бородатих» коренів різних ліній рослин, досліджено противірусну та протизапальну дії екстрактів. Важливою частиною роботи є визначення оптимального режиму освітлення, а також застосування метилжасмонату для стимуляції росту і підвищення продуктивності культур «бородатих» коренів в аспекті отримання флавоноїдовмісних екстрактів полину.

Практичне значення одержаних результатів.

У результаті проведених досліджень автором виділено високопродуктивні лінії рослин полину з ефектом утворення «бородатих» коренів, оптимізовано умови отримання комплексів біологічно активних сполук, що є перспективними для виробництва сухих екстрактів і подальшою розробкою фітопрепаратів на їхній основі.

Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях

За матеріалами дисертації опубліковано 21 наукову працю, з них 6 наукових статей, у тому числі 4 – у фахових наукових виданнях України та 2 – опубліковані у зарубіжних наукових періодичних виданнях, включених до міжнародної наукометричної бази WoS та/або Scopus та 13 тез доповідей на наукових конференціях.

Структура та зміст дисертації, її завершеність та відповідність встановленим вимогам. Робота виконана на 200 сторінках друкованого

тексту, містить 2 таблиці та 31 рисунок і складається з переліку умовних позначень, анотації, вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел і додатків. Основна частина роботи викладена на 114 сторінках друкованого тексту. Перелік використаних літературних джерел включає 351 найменування, з яких 342 – латиницею. Додатки до основного змісту викладено на 11 сторінках

У вступі, структура якого повністю відповідає вимогам, автор обґрунтовує актуальність теми дисертаційної роботи, формулює предмет, мету і завдання досліджень, характеризує об'єкт, висвітлює наукову новизну та практичне значення одержаних результатів

У першому розділі проаналізовано біохімічний склад *Artemisia tilesii* Ledeb. і описано основні лікувальні властивості її компонентів, що пояснює популярність полину в традиційній і нетрадиційній медицині різних народів та перспективність проведення дослідження цього виду для отримання з комплексу особливо цінних сполук. Також розкрито основні положення доцільності і технології використання *Agrobacterium rhizogenes* для успішної генетичної трансформації рослин та ініціації росту «бородатих» коренів. Описано функціональні особливості генів вірулентності агробактерій, які забезпечують перенос Т-ДНК. Також розкрито роль генів *rol* і *aux* у культурах генетично трансформованих рослин, які покращують сприйнятливність клітин до фітогормонів, відповідають за формування «бородатих» коренів і беруть участь у регуляції вторинного метаболізму рослинних тканин. Також показано переваги векторів з додатковими генами, які здатні впливати на активність ферментів і регулювати окремі ланки метаболізму в рослинному організмі.

Важливою частиною огляду літератури в рамках предмету досліджень є підрозділ, в якому проаналізовано сучасний досвід щодо умов вирощування культур «бородатих» коренів для отримання цільових продуктів, підбір складу живильних середовищ та використання індукторів синтезу вторинних метаболітів.

У другому розділі описані матеріали проведення досліджень, описані отримані лінії культур «бородатих» коренів. Детально представлено методологію виконання генетичної трансформації рослин *Artemisia tilesii* з використанням *Agrobacterium rhizogenes*, а також проведення вегетаційних та біотехнологічних експериментів, субкультивування ліній «бородатих» коренів і визначення швидкості їхнього росту.

Окремими виділено блоки молекулярно-генетичних і біохімічних досліджень, які дозволили автору роботи підтвердити успішність проведення генетичної трансформації рослин, оцінювати експресію генів, які відповідають за фенольний синтез, а також виконувати аналіз якісного і кількісного складу вторинних метаболітів, їхню антиоксидантну активність, протизапальну та противірусну дії.

У третьому експериментальному розділі автором традиційно представлено результати власних досліджень. Показано ініціацію росту «бородатих» коренів. За допомогою праймерів, специфічних до генів *rolB* і *rolC*, проаналізовано рослинний матеріал і підтверджена їх наявність у всіх досліджених лініях культур «бородатих» коренів. Проведено мікроскопічний аналіз коренів і показано морфологічні відмінності коренів та виявлено різницю в швидкості їхнього росту у різних ліній. Встановлено, що антиоксидантна і відновна активності екстрактів досліджуваних ліній була вищою за контрольні зразки. Водночас, визначення вмісту флавоноїдів не виявило суттєвих відмінностей між двома групами ліній за рівнем антиоксидантної активності.

Аналіз ферментативних та неферментативних систем захисту рослинних клітин від вільних радикалів показав варіативність у показниках ефективності їх роботи незалежно від наявності гетерологічних генів у досліджуваних лініях «бородатих» коренів. У трансформованих рослин, порівняно з контролем, виявлена висока активність супероксиддисмутази. Водночас, встановлено що відносна активність генів фенілаланін-амоній-ліази та халконсинтази в різних лініях була меншою, ніж в контролі. Автор детально проаналізував отримані

результати і порівняв їх з даними інших дослідників, що робить висновки до підрозділів дисертації обґрунтованими, хоча в деяких аспектах дискусійними.

Методом рідинної хроматографії проведено порівняльний аналіз якісного і кількісного складу фенолкарбонових кислот в екстрактах різних ліній «бородатих» коренів. На жаль, автором не проаналізовано якісний склад флавоноїдів, що б покращило інтерпретацію отриманих результатів. В цілому біохімічні профілі фенолкарбонових кислот викликають питання, відповіді на які можуть представляти значний інтерес для кращого розуміння фенольного синтезу рослин.

На особливу увагу заслуговують результати оцінки протизапальної і антивірусної активності екстрактів з «бородатих» коренів полину. Дозозалежна активність рослинних екстрактів підтвердили доцільність вирощування цих культур для створення на їх основі ефективних препаративних форм, спрямованих на профілактику і лікування вірусних хвороб.

У результаті оптимізації умов культивування генетично трансформованих рослин було визначено вплив режиму освітлення, дію фенілаланіну і метилжасмонату на динаміку росту коренів і процеси вторинного синтезу. Оптимізовано також спосіб отримання сухих екстрактів «бородатих» коренів полину Тілесіуса.

Отже, автором підтверджено доцільність застосування технології отримання «бородатих» коренів для синтезу цінних біологічно активних сполук.

Ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків, сформульованих у дисертації.

Висновки дисертаційної роботи є цілком логічним результатом аналізу отриманих даних і достатньо повно представляють основні положення власних досліджень. Автором обґрунтовано доведена доцільність і ефективність застосування технології отримання культури «бородатих» коренів, визначено специфіку вторинного метаболізму генетично трансформованих рослин на рівні експресії ключових генів і синтезу індивідуальних сполук, а також

оптимізовано умови культивування культур із застосуванням низькомолекулярних модуляторів фенольного синтезу.

Відсутність порушення академічної доброчесності. У роботі не виявлено фактів академічного плагіату, а також фабрикацій або фальсифікації. Для всіх представлених публікацій у співавторстві автором дисертації вказано особистий внесок. Анотація висвітлює основний зміст дисертаційної роботи і не містить положень або ідей, які не наведено в основному тексті.

Дискусійні положення та зауваження до дисертації.

1. Не зрозуміло з якою метою використовувався штам *Agrobacterium rhizogenes*, що мав вектор з гетерологічним геном інтерферону- $\alpha 2b$ людини.

2. У розділі 2.4. не вказано яким приладом вимірювали концентрацію зразків РНК.

3. Для кращого співставлення результатів різних експериментів доцільно було б використовувати єдину методику екстракції флавоноїдів.

4. Для аналізу даних у дисертаційній роботі використовувався t-критерій Стьюдента, який прийнятний для порівняння середніх значень двох вибірок за умов їх відповідності критерію нормального розподілу. Враховуючі кількість повторів і незалежних вибірок у цій роботі, доцільно було застосовувати непараметричні методи аналізу (наприклад, однофакторний дисперсійний аналіз Краскела – Уоліса).

5. Для перевірки достовірності відмінностей між варіантами досліду використовувався апостеріорний тест Тьюки, але на графіках ці результати не представлені.

6. Сумнівним є висловлювання автора щодо переваг в отриманні «бородатими» коренями складних комплексів фенольних сполук (с. 94) порівняно з одним цільовим продуктом, синтез якого є бажаним і очікуваним.

7. Заслуговує на увагу відсутність в екстрактах більшості отриманих ліній рослин з «бородатими» коренями р-кумарової кислоти (табл. 3.1). Як тоді пояснити наявність у всіх досліджуваних зразках кавової кислоти, що утворюється з р-кумарової і є попередником ферулової кислоти?

8. В описі цитотоксичної дії екстрактів по відношенню до типу розчинника і концентрації флавоноїдів (с. 98) краще не вживати визначення «параметри», оскільки розчинник не є величиною, яка змінюється в часі, а флавоноїди – клас сполук, які суттєво вирізняються між собою за фізичними і біохімічними характеристиками.

9. Дискусійним є віднесення метилжасмоната до категорії еліситорів (с. 56, с. 121), оскільки його молекули синтезуються рослинним організмом і виконують регуляторні та сигнальні функції в системі захисту рослин.

10. Оскільки результати апостеріорного аналізу з використанням критерія Тьюки не представлені на рис. 3.30, не зрозуміло чи існує достовірна різниця між варіантами досліджу. Також дещо сумнівним є оцінювання сумарної дії флавоноїдів в екстрактах як синергічної або адитивної, оскільки в експерименті зміна біомаси тест-культури суттєво не перевищувала їхню продуктивність в умовах контролю, а також за дією окремих флавоноїдів.

11. На рисунку 3.6, В показано графіки з рівняннями лінійної регресії, які описують залежність між вмістом флавоноїдів і антиоксидантною активністю екстрактів. Відносно низькі значення коефіцієнтів детермінації (R^2) автором пояснюються тим, що різні флавоноїди мають різні рівні біологічної активності. Варто зауважити, що реагент DPPH виявляє дію не тільки флавоноїдів, а й усіх фенольних сполук, які містяться в екстрактах і мають антиоксидантну активність.

12. У роботі основний акцент було зроблено на флавоноїдах, тому варто було представити хроматографії, які б свідчили про їхній якісний склад та кількісне співвідношення в екстрактах.

Загальний висновок.

Зроблені зауваження і рекомендації не зменшують наукового і практичного значення виконаної роботи, а свідчать про складність і новизну предмета досліджень.

Дисертаційна робота Богданович Таїси Андріївни «Розробка біотехнології отримання сполук з протизапальними та антиоксидантними

властивостями з «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* Ledeb.», подана на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія за актуальністю, ефективністю вирішення поставлених завдань та практичним значенням її основних положень, є самостійною закінченою науковою роботою, яка відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (Постанова Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44) та «Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)», що набрав чинності від 1 січня 2024 року і затверджений постановою Кабінету Міністрів України від 19 травня 2023 року № 502. Отже, дисертантка, Богданович Таїса Андріївна, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук, доцент,
професор кафедри ботаніки,
дендрології та лісової селекції
Національного університету біоресурсів
і природокористування України



Артур ЛІХАНОВ

