

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, старшого наукового співробітника, провідного наукового співробітника відділу генетичного поліпшення рослин Інституту фізіології рослин і генетики НАН України
Дубровної Оксани Василівни

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 в галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність теми досліджень. Виробництво біологічно активних речовин на основі використання генно-інженерних підходів має великий потенціал і є яскравим прикладом тих переваг, які надає сучасна біотехнологія рослин. Рослини, як природні «біореактори», мають низку переваг з отримання фармацевтичних білків порівняно з клітинами мікроорганізмів та тварин, зокрема ті, що білки, синтезовані в рослині, не потрібно піддавати денатурації та ресинтезу; у препаратах, отриманих з рослин, значно менше або й зовсім відсутні бактеріальні токсини, небажані віруси, онкогенні послідовності та пріони.

Рослини полину належать до лікарських і здавна використовуються в народній та класичній медицині завдяки властивостям біологічно активних сполук, які синтезуються у цих рослин, зокрема артемізінін, флавоноїди, кумарини, сесквітерпени, таніни, глікозиди, аскорбінова кислота, інулін, полісахариди, каротин, дубильні речовини, ефірні олії. Разом з тим, досі мало вивченим є вид *Artemisia tilesii* Ledeb. Ці рослини пристосовані до екстремальних умов існування і можуть бути джерелом біологічно активних компонентів, зокрема поліфенольних сполук. Поліфеноли, до яких відносяться і флавоноїди, є біологічно активними речовинами з відновною, антиоксидантною, протизапальною, антиатеросклеротичною, протівірусною та цитостатичною активностями.

Різноманіття та синтез, а отже і терапевтичну дію цих сполук можливо підвищити, використовуючи метод *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації. Цей метод набув значного поширення для створення рослинних зразків, які є продуцентами біологічно активних сполук. Встановлено, що за генетичної трансформації з використанням *A. rhizogenes*, можливо отримати культури «бородатих» коренів, які можуть рости необмежений час на середовищах без додавання регуляторів росту та синтезувати біоактивні сполуки, зокрема флавоноїди, у кількості, що значно перевищує таку у вихідних рослинах, що зумовлено перенесенням у геном рослини генів *A. rhizogenes*. Трансформація впливає на метаболізм рослин, а поява нових специфічних ознак дозволяє вирощувати отримані корені у великих промислових масштабах, використовуючи біореактори. Саме тому зусилля дослідників були спрямовані на розроблення методології генетичної трансформації та отримання «бородатих» коренів лікарських рослин різних видів.

Хоча полин Тілесіуса здавна використовується у медицині, проте культури «бородатих» коренів рослин цього виду є маловивченими, адже ця рослина зустрічається лише на півночі Канади, Японії, Сибіру, Аляски. Застосування *Artemisia tilesii* у медицині, його витривалість та наявний спектр біологічно активних речовин, свідчать на користь важливості подальшого дослідження цього виду та можливості отримання з нього комплексу цінних сполук. У зв'язку з цим, дисертаційна робота Богданович Т.А., присвячена створенню «бородатих» коренів з високим вмістом флавоноїдів, антиоксидантною, відновною та протизапальною активністю; стимулюванню синтезу поліфенольних сполук та отриманню сухих екстрактів з коренів полину, які можуть бути використані для створення нових ліків з антиоксидантними та протизапальними властивостями є безумовно актуальною і практично значимою, оскільки такі експериментальні роботи надають важливий фактичний матеріал як для подальшого розвитку генетичної інженерії, як одного із фундаментальних напрямів біотехнології рослин, так і для практичного використання у медицині.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дослідження за темою дисертаційної роботи виконувались в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України згідно з бюджетними темами II-1-23 «Синтез рекомбінантних фармацевтичних білків та підвищення вмісту біологічно активних природних сполук в рослинах. Розділ 1 (реєстраційний номер: 0123U101081); II-3-20 «Індуковані зміни спектра біологічно активних сполук та накопичення білків генно-інженерного походження в рослинах (реєстраційний номер: 0122U001510); III-1-20 «Цілеспрямовані зміни геному та плейотропні ефекти у генетично трансформованих рослинних системах» (реєстраційний номер: 0120U100849).

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше проведено комплексний аналіз отриманих «бородатих» коренів *A. tilesii*, зокрема визначено відмінності у вмісті флавоноїдів, антиоксидантної та відновлювальної активностей, вмісті пероксиду водню, активностей супероксиддисмутази та каталази, а також проведено порівняння особливостей ліній, отриманих з використанням дикого штаму *A. rhizogenes* та тих, що мають гетерологічні гени *ifn-α2b* та *nptII*. Уперше методом ВЕРХ порівняно вміст фенольних кислот зразків «бородатих» коренів полину Тілесіуса. Уперше доведено пряму кореляцію активності *rolB* та *rolC* генів зі швидкістю росту «бородатих» коренів *A. tilesii* та обернену кореляцію активності *PAL* з вмістом флавоноїдів. Уперше визначено вплив фенілаланіну, освітлення та метилжасмонату на ріст культур «бородатих» коренів *A. tilesii*, синтез флавоноїдів та антоксидантну активність. Уперше показано наявність протівірусної та протизапальної активностей у екстрактах «бородатих» коренів *A. tilesii*. Уперше оптимізовано спосіб отримання флавоноїдовмісних екстрактів з «бородатих» коренів полину з використанням двоетапного культивування та еліcitaції метилжасмонатом.

Теоретичне значення результатів досліджень. Дослідження, проведені автором, вносять суттєвий вклад у розвиток нового напрямку – метаболічної інженерії рослин, надають нові перспективи для вирішення

фундаментальних питань молекулярних біотехнологій та трансмісійної генетики. Результати, наведені у дисертації, поглиблюють та розширюють уявлення: про генетичні та фізіолого-біохімічні основи детермінованості процесів трансгенезу в умовах *in vitro*; *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію та експресію генів; екзогенні та ендогенні чинники, які лімітують накопичення вторинних метаболітів; можливі шляхи підвищення вмісту вторинних метаболітів.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані лінії «бородатих» коренів, які проявили антиоксидантну, відновлювальну, протівірусну та протизапальну активності, можуть бути джерелом цінних біологічно активних сполук. Сухий екстракт, отриманий з таких коренів, може використовуватись як основа для виробництва препаратів з рослинної сировини. Оптимізований спосіб отримання біоактивного флавоноїдовмісного комплексу дозволяє ефективно використовувати корені та масштабувати процес за допомогою культивування коренів на безгормональному рідкому середовищі в біореакторах. Результати теоретичних та практичних досліджень можуть представляти інтерес для фармацевтичної та медичної галузей, а також для біотехнологів та представників промисловості, які зацікавлені у інтенсифікації виробництва сполук з цілим спектром біологічних активностей.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях. Матеріали дисертації відтворені в публікаціях автора і знайшли належне висвітлення на вітчизняних та міжнародних наукових форумах. Зокрема, за матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 21 наукову працю, з них 6 наукових статей, у тому числі 4 – у фахових наукових виданнях України та 2 – у зарубіжних наукових періодичних виданнях, включених до міжнародної наукометричної бази WoS та/або Scopus, глава монографії та монографія, опубліковані закордоном, та 13 тез доповідей на наукових конференціях.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертант проаналізував значний масив даних літератури з отримання «бородатих» коренів з

використанням *Agrobacterium rhizogenes* – опосередкованої трансформації та її вплив на синтез вторинних метаболітів; способи оптимізації живильних середовищ та застосування еліситорів для активізації синтезу цінних біологічно активних сполук у «бородатих» коренях. Автором доведена важливість використання цього методу у різних галузях теоретичних досліджень і на практиці.

Понад 90 відсотків використаних літературних джерел – публікації останніх років. Це дало змогу обґрунтувати вибір теми наукової роботи та методичних підходів для реалізації поставлених завдань.

Логічне та конкретне планування досліджень дозволило пошукачу виконати поставлені завдання і одержати значний обсяг експериментального матеріалу. При виконанні роботи дисертантом застосовано сучасні методи досліджень, а саме: біотехнологічні (*Agrobacterium rhizogenes* – опосередкована генетична трансформація), фізіологічні та біохімічні, молекулярно-генетичні, методи статистичного аналізу даних.

Наукові результати дисертації отримано на підставі аналізу великого фактичного матеріалу, з використанням сучасних і адекватних поставленим завданням методів досліджень. Достовірність результатів підтверджується відповідною статистичною обробкою. Тому, вважаю, що наукові положення дисертації, її висновки є цілком обґрунтованими, мають значне практичне й теоретичне значення і відповідають високому науковому рівню роботи.

Структура та зміст дисертації, її завершеність та відповідність встановленим вимогам. У дисертаційній роботі чітко визначені ідея досліджень, робоча гіпотеза та логіка постановки експериментів. Вона має класичну структуру та складається з переліку умовних позначень, анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел, додатків. Основна частина роботи викладена на 114 сторінках друкованого тексту, проілюстрована 2 таблицями та 31 рисунками. Список використаних джерел складається з 351 найменування, з яких 342 – латиницею. Загальний обсяг рукопису становить 200 сторінок.

Вступ написаний відповідно до чинних вимог. У ньому обґрунтовано

актуальність теми, сформульовано мету та завдання роботи, а також наведено основні положення наукової новизни і практичного значення отриманих результатів.

У розділі «Огляд літератури» дана характеристика рослин *Artemisia tilesii* Ledeb. – продуцента біологічно активних речовин; розглянуто особливості бактерій *Agrobacterium rhizogenes* та можливість їх використання для генетичної трансформації і отримання «бородатих» коренів; узагальнено наявну інформацію про характеристики «бородатих» коренів та дію *rol*-генів; висвітлено вплив *A. rhizogenes* – опосередкованої трансформації на синтез вторинних метаболітів; наведено способи оптимізації живильних середовищ та застосування еліситорів для активізації синтезу цінних біологічно активних сполук у «бородатих» коренях. Викладений в літературному огляді матеріал свідчить про володіння дисертантом інформацією про сучасний стан проблеми, що дозволило їй вибрати адекватні методичні підходи для вирішення основної мети та завдань, які поставлені в роботі.

У розділі «Матеріали та методи досліджень» детально описано умови проведення експериментів: рослинний матеріал, представлений колекцією Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, та умови його вирощування; генетичної трансформації з використанням *Agrobacterium rhizogenes*; молекулярно-біологічного аналізу (ПЛР та ПЛР у реальному часі); визначення швидкості росту «бородатих» коренів та їх дослідження методом світлової мікроскопії; фізіолого-біохімічного визначення вмісту біоактивних сполук у «бородатих» коренях полину та біологічної активності екстрактів; отримання наночасток срібла та їх аналіз; хроматографічні дослідження; визначення впливу складу живильного середовища на ріст «бородатих» коренів та накопичення флавоноїдів; отримання флавоноїдовмісного комплексу сполук на основі екстракту «бородатих» коренів; визначення біобезпечності отриманого флавоноїдовмісного комплексу сполук; статистичної обробки результатів досліджень.

У розділі «Результати та їх обговорення» представлено результати проведених досліджень по створенню «бородатих» коренів полину Тілесіуса

з високим вмістом флавоноїдів, антиоксидантною, відновною та протизапальною активністю, а також стимулювання синтезу поліфенольних сполук та отримання сухих екстрактів, які мають біологічні активності. Скринінг двох груп «бородатих» коренів (отриманих шляхом генетичної трансформації з використанням *A. rhizogenes* дикого штаму A4 та ліній з гетерологічними генами *ifn-α2b* та *nptII*) виявив відмінності за фізіологічними, біохімічними, морфологічними характеристиками коренів різних ліній, однак відсутність специфічних рис, притаманних кореням тільки однієї групи. Автором показано, що генетична трансформація привела до появи варіабельності вмісту флавоноїдів, антиоксидантної та відновлювальної активності, вмісту пероксиду водню, активності супероксиддисмутази та каталази. Генетична трансформація спричинила підвищення вмісту флавоноїдів, антиоксидантної та відновлювальної активності, а також активності супероксиддисмутази у всіх зразках «бородатих» коренів порівняно з цими показниками у коренях контрольних рослин, причому було показано наявність кореляції між вмістом флавоноїдів, антиоксидантною та відновлювальною активностями. Трансформація впливала на ряд морфологічних та фізіологічних параметрів: забарвлення, структура та швидкість росту коренів різних ліній значно відрізнялись, причому специфічні ознаки – здатність рости на середовищі без регуляторів росту та негативний геотропізм – зберігались в усіх досліджуваних лініях. У «бородатих» коренях активність *rolB* та *rolC* генів корелювала зі швидкістю росту: в усіх лініях більший приріст маси спостерігався у зразках з більшою активністю *rolB* та *rolC*. Разом з тим, рівень активності фенілаланінамоніліази обернено співвідносився з вмістом флавоноїдів в усіх дослідних лініях: чим вищим був вміст, тим меншою була активність *PAL*. Значимих відмінностей у відносних активностях генів *rolB*, *rolC*, *PAL* та *CHS* між двома групами ліній «бородатих» коренів не відзначалося.

Генетична трансформація привела до ряду змін вторинного метаболізму, зокрема вмісту фенольних кислот у порівнянні з контрольними коренями. Хінна та 4-гідроксифенілоцтова кислоти були ідентифіковані лише у контролі і відсутні в усіх лініях «бородатих» коренів. Разом з тим, транс-

корична кислота синтезувалася в усіх лініях «бородатих» коренів і була відсутня у контролі. Отримані після трансформації лінії мали не тільки відмінний якісний, а й кількісний склад фенольних кислот. Одна лінія (№ 15) мала більший вміст одразу шести фенольних кислот у порівнянні з контрольним зразком. Таким чином, було отримано зразки зі значно більшою кількістю окремих фенольних кислот, їх значною варіабельністю та наявністю сполук, відсутніх у контролі. Екстракти «бородатих» коренів проявляли дозозалежну протизапальну активність, а також активність проти вірусу грипу H1N1 (інгібуюча дія екстракту на проліферацію вірусу). Дисертантом встановлено, що завдяки наявності відновної активності, екстракти «бородатих» коренів можуть бути використані для отримання наночасток срібла, причому вміст флавоноїдів у екстрактах корелював з висотою піку поглинання при спектрофотометрії на довжині хвилі 440 нм: чим вищим був вміст, тим вищим був пік абсорбції.

Значна увага у роботі приділена вивченню впливу умов культивування на ріст «бородатих» коренів. Показано, що зміна умов культивування має вплив на морфологію «бородатих» коренів полину Тілесіуса, швидкість росту та біосинтез вторинних метаболітів. Наявність освітлення приводить до формування коренів зеленуватого кольору з більшим галуженням та товщиною. Освітлення також стимулює ріст коренів та вторинний метаболізм, приводячи до збільшення приросту маси, вмісту флавоноїдів та антиоксидантної активності, причому така тенденція зберігалась і при додаванні 0.05 та 0.1 мМ фенілаланіну. Корені, вирощені на світлі, після додавання цієї сполуки росли краще на світлі та синтезували більше флавоноїдів. Таким чином показано, що наявність освітлення є важливим фактором для підвищення біосинтетичного потенціалу коренів. Додавання фенілаланіну до живильного середовища не приводило до збільшення загального вмісту флавоноїдів у біомасі коренів, а пригнічували ріст. Метилжасмонат у концентраціях 10, 50 та 100 мкМ, незважаючи на деяку інгібуючу дію на ріст «бородатих» коренів *A. tilesii*, значно стимулював синтез флавоноїдів та підвищував антиоксидантну активність в усіх лініях вже після двох діб культивування на живильному середовищі із цією

сполукою (у 2.21 -5.21 раза).

Дисертантом детально описано отримання флавоноїдвмісного комплексу сполук та його перевірка на біобезпечність. Оптимізований спосіб отримання сухих флавоноїдовмісних екстрактів «бородатих» коренів полину Тілесіуса, який полягає у двоетапному культивуванні коренів з метилжасмонатом та наступною ліофілізацією і екстрагуванням. Оскільки вміст сухої речовини у коренях становив 14.8%, з яких було отримано 270 мг сухого екстракту, таким способом можна отримати 382.12 мг флавоноїдів зі 100 г свіжих коренів. Отриманий сухий екстракт не тільки не проявляв токсичної дії при його тестуванні на рослинах ряски *in vitro*, але й мав рістстимулюючу активність. Таким чином, даний сухий комплекс сполук, отриманий з «бородатих» коренів оптимізованим способом, може слугувати основою для виробництва біобезпечних препаратів з рослинної сировини з антиоксидантною, противірусною, протизапальною та відновною дією. Цей спосіб отримання біоактивного екстракту у подальшому може бути ефективно використаний при масштабуванні процесу вирощування коренів на безгормональному рідкому середовищі в біореакторах.

Висновки до розділів та за результатами роботи логічно впливають з описаних результатів та відповідають змісту дисертаційної роботи.

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності. Аналіз тексту дисертації свідчить про відсутність порушення автором вимог академічної доброчесності. Використані ідеї і результати інших авторів мають посилання на відповідне джерело, дотримано вимоги норм законодавства про авторське право. У роботі не виявлено ознак академічного плагіату, фабрикації, фальсифікації. Для всіх публікацій у співавторстві чітко зазначено особистий внесок дисертанта. Анотація відображає основний зміст дисертаційної роботи. Вона не містить положень чи ідей, що не наведені в основному тексті.

Пропозиції та зауваження до дисертації. Стосовно оформлення дисертації: матеріал викладено чітко і логічно, науковою мовою, доцільно проілюстровано рисунками. Суттєвих зауважень до роботи немає, в основному вони носять технічний характер.

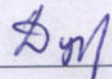
1. Текст дисертації містить певну кількість орфографічних та стилістичних помилок, зокрема «звоотньої транскриптази» (с.64); «Отримання культури «бородатих» коренів та їх ПЛР аналіз» замість її. Дисертант пише то «поживне», то «живильне» середовище; назви ферментів то зливо, то через дефіс.
2. У «Переліку умовних позначень» автор дає окремі позначення лише англійською мовою і не наводить розшифровку українською. Наприклад, DE – dry extract; DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ; RE – rutin equivalent. Дисертант пише «Т-ДНК – транспортна ДНК», хоча як такої її не існує. У ДНК немає функції щось транспортувати, є лише «транспортна РНК». У даному випадку Т-ДНК (перенесена ДНК) - це ДНК пухлиноіндукуючої (Ri) плазмиди *Agrobacterium rhizogenes*, перенесена з бактерії в ядерний геном рослини-господаря.
3. Наявні не зовсім коректні вирази, зокрема автор пише «гени хромосомної вірулентності», хоча хромосомної вірулентності не існує, а є лише гени вірулентності, які містяться у певних локусах хромосом. «Це може бути пов'язано з можливою функцією гена *rolB* у збільшенні або зниженні передачі сигналів активних форм кисню (ROS), хоча гени сигналів не передають (для цього є молекулярна мережа сигналізації), а їх білкові продукти сприяють поглинанню активних форм кисню. «Надлишкова експресія ферменту», хоча експресується ген, а не його продукт. «перетворює прості цукри з гліколізу» замість шляхом гліколізу.
4. Деякі формули дисертант дає англійською мовою, наприклад відсоток інгібування (с.66).
5. Цифрові значення бажано було б навести у одній розмірності – представлені величини, прийнято округляти до одного і того ж знаку (наприклад, на с. 133 наведено кількість листеців 219 ± 15.68 шт .
6. Штуки – це ціле число, і не може бути виражене у іншому вимірюванні. тому краще у таких випадках використовувати «в середньому».

Загальна оцінка роботи і висновок. В цілому, за актуальністю, обсягом експериментального матеріалу, його новизною, науковим і практичним значенням, рівнем застосованих експериментальних підходів

дисертаційна робота “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 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)», який набрав чинності від 1 січня 2024 року і затверджений постановою Кабінету Міністрів України від 19 травня 2023 року № 502. Дисертантка, Богданович Таїса Андріївна, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

Дубровна Оксана Василівна,
доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
провідний науковий співробітник
відділу генетичного поліпшення рослин
Інституту фізіології рослин і генетики
Національної академії наук України

 Оксана ДУБРОВНА

