

До разової спеціалізованої вченої ради ID3676
Інституту клітинної біології та генетичної інженерії
вул. Академіка Заболотного, 148, м. Київ, 03143

ВІДГУК

офіційного опонента, кандидата біологічних наук, старшого наукового співробітника відділу генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Пороннік Оксани Олександрівни

на дисертаційну роботу Тараса Вадимовича ГАЛИЧА

*«Зв'язок ураження геному за різних типів опромінення із стимуляцією утворення фармацевтичних сполук *Matricaria chamomilla* L.» подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»*

Актуальність теми дисертаційного дослідження

Сучасне зростання використання рослин в офіційній медицині вимагає розширення підходів до отримання більшої кількості традиційних лікарських речовин з цієї природної сировини, пошук нових рослинних джерел і сполук, які б мали практичне застосування. Поряд з пошуком нових видів лікарських рослин, виведенням більш продуктивних сортів вже відомих видів, використовуються нові молекулярно-генетичні підходи до переорієнтації метаболізму організмів в бік збільшення необхідних для практики речовин. На сьогодні, біологічні науки надають багату інформацію про розвиток стресових реакцій рослин, що стимулюють захисні механізми рослинних організмів і переорієнтацію метаболізму з підвищенням корисних для медичної практики речовин.

Одним з ефективних підходів є використання в якості абіотичного стресу різних форм опромінення. Відомо, що при їх дії спостерігається зсув метаболічних процесів у бік утворення речовин вторинного метаболізму, до складу яких входить більшість радіопротекторів, що мають антиканцерогенну, імуномодельную і протизапальну дію та застосовуються в фармакології. Застосування радіаційних методів для стимуляції напрацювання фармацевтичної продукції виявило його значні практичні переваги: передпосівне опромінення насіння рослин дозволяє одержувати стимуляцію утворення цільових продуктів в фармацевтичній сировині, що безпосередньо не опромінювалась і утворилась через тижні, чи навіть місяці вегетації. На сьогодні нагромаджено значний матеріал відносно підвищення за рахунок різних видів і доз опромінення виходу фармацевтичної продукції у різних лікарських рослин за умов передпосівного опромінення насіння.

Разом з тим лишаються відкритими багато питань, що мають, на перший погляд, теоретичний зміст, але вирішення яких необхідно для переходу від суто феноменологічних досліджень до надійних практичних застосувань радіаційних методів. Вирішенню деяких ключових теоретичних, з огляду на практичне застосування, присвячена робота, що рецензується.

Перше з цих питань потребує пояснення надійно встановленого факту, що лікарські рослини, які належать до одного виду, але різних сортів по – різному реагують на різні види опромінення. Цей ефект виявляє проявляється сортове розмаїття в організації первинного і вторинного метаболізму рослин, природа якого лишається нез'ясованою, і привертає увагу до молекулярно-генетичного підґрунтя стимуляції у різних генотипів двох технологічно важливих характеристик – врожайності фармацевтичної сировини та нагромадження лікарських речовин у ній. Разом з суто теоретичною важливістю цього питання воно є важливим у біотехнологічному використанні опромінення, ключовим при залученні, відборі певних сортів при використанні певного типу опромінення.

Другим, не менше важливим із теоретичної і практичної точки зору є питання про механізми і фактори, що формують віддалені у часі метаболічні перебудови у фармацевтичній сировині за умов передпосівного опромінення. На сьогодні біофізичними і біохімічними методами добре досліджено виникнення прямих, безпосередніх, швидких уражень макромолекул, зокрема ДНК, опроміненням різних типів і практично невідомі механізми трансформації цих уражень у віддалені наслідки, що пов'язані з довготривалими метаболічними перебудовами у структурах, які безпосередньо не опромінювались і є фармацевтичною сировиною.

Ці два питання фактично являє собою одне ціле з точки зору коротко- та довготривалих уражень геному при опроміненні. Ці недосліджені питання, відсутність відповіді на них і необхідність їх з'ясування для руху вперед у фундаментальній науці і біотехнологічному її використанні визначають актуальність дисертаційної роботи, що виноситься на захист.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Робота була виконана в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України під час навчання на аспірантурі у 2019-2023р, у відділі біофізики та радіобіології у рамках бюджетної наукової роботи: ІІІ-7-19 «Підвищення продуктивності лікарських рослин шляхом передпосівного ультрафіолетового опромінення насіння»; ІІІ-6-22 «Стимуляція утворення антиоксидантних, онкопротекторних та протизапальних сполук передпосівним опроміненням насіння салатних овочів та лікарських рослин»; ІІІ-2-23 Генетичні і епігенетичні механізми та фактори захисних і адаптивних реакцій рослин.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Запорукою обґрунтованості сформульованих у дисертації положень і висновків є високий методичний рівень здійсненого дослідження, що дозволило публікації результатів в наукових журналах з високим рейтингом (Q1, Q3, сумарний ІА=3,442). Вдалим вибором для фактично мета – дослідження є ромашки *Matricaria chamomilla* L., оскільки ця однорічна лікарська рослина широко практичним застосовується у медицині і косметології, великим ареалом розповсюдження, невибагливістю умов вирощування та має певне сортове розмаїття. Для досягнення мети дослідження цілком логічним є оцінка відкладеного у часі радіаційно-індукованого ураження ДНК (шляхом виявлення ступеня відхилення первинної структури ДНК опромінених від неопроміненого варіанту), а також зв'язок цього із перебудовами первинного та вторинного метаболізму. Аналіз вмісту антиоксидантних сполук, таких як феноли та флавоноїди, є інформативним маркером метаболічних перебудов організму та ураження ДНК, має практичну спрямованість, тобто використання в лікувальних цілях. У роботі використано широкий спектр сучасних методів, проведено інформативний кількісний аналіз, використані методи різноманітні статистичні методи, що засвідчує достатній рівень оволодіння здобувачем методології наукових досліджень.

Структура роботи

Дисертаційна робота має традиційну структуру і складається з шести розділів: огляд літератури, «Матеріали і методи», четвертий- шостий розділи, присвячені опису власних досліджень Тараса Галича. Дисертаційна робота викладена на 158 сторінках і складається із вступу, 6 розділів, висновків, списку використаних джерел, що включає 189 статей та монографій. Робота містить 20 таблиць, 31 рисунок, 1 додаток.

У першому розділі, що має назву розглянуто не тільки сучасний стан саме цієї проблеми (власне, «здобутки» радіаційних біотехнологій), але й новітні досягнення тієї гілки молекулярної біології і генетики, яка відноситься до біофізичних механізмів і факторів стійкості первинної структури ДНК, структурних і функціональних механізмів забезпечення її стабільності, дослідження стресових реакцій рослини на рівні геному, тобто механізмів первинного, прямого ураження іонізуючим і неіонізуючим опроміненням, виникнення можливих довготривалих порушень в геномі (явище геномної нестабільності, конститутивної та індукційної компоненти репарації, механізмів антиоксидантного захисту).

В другому розділі докладно описано проведення вегетаційних і польових досліджень, підготовку рослинного матеріалу для біохімічного і молекулярно –

генетичного аналізу, методів, які використовував здобувач. Оцінка ефектів геномної нестабільності проведено шляхом взаємодії сучасних молекулярно-генетичних методів і методів кластерного аналізу, що надало змогу глибше проаналізувати зв'язок дозових залежностей порушення первинної структури ДНК із стимуляцією захисних реакцій.

В третьому розділі дисертаційної роботи був проведений аналіз зв'язку ефективності різних типів опромінення по двом показникам підвищення продуктивності різних генотипів з мінісателітним поліморфізмом їхньої ДНК, і показано дещо неочікувані результати. Головним здобутком цих розрахунків, є встановлення чіткого зв'язку поліморфізму ДНК по RAPD - послідовностях з продуктивністю фармацевтичної сировини і відсутність такого зв'язку як по RAPD, так і ISSR-послідовностям для стимуляції питомого вмісту фенолів і флавоноїдів.

В розділі чотири розглядалося питання впливу передпосівного рентгенівського і опромінення на формування віддалених ефектів, а саме досліджувався зв'язок між станом радіаційно-індукованої нестабільності геному і захисною відповіддю організму, зокрема стимуляцією синтезу та накопичення антиоксидантів. В результаті проведеного дослідження було встановлено, що явище стимуляції напрацювання антиоксидантів, як у випадку іонізуючого, пов'язано із взаємодією між розвитком ураження ДНК і активацією репаративних процесів, розпізнаванням помилкової первинної структури ДНК та відповідної конформації хроматину.

У п'ятому розділі викладено і проаналізовано питання впливу передпосівного УФ-С опромінення на формування віддалених метаболічних перебудов, маркерами яких були обрані питомий вміст фенолів і флавоноїдів. Важливо, що показано значні відмінності у взаємозв'язку ефектів геномної нестабільності для цього типу опромінення і дозової залежності вмісту низькомолекулярних антиоксидантів. Встановлено, що явище стимуляції напрацювання антиоксидантів, як у випадку іонізуючого, пов'язано із взаємодією між розвитком ураження ДНК і активацією репаративних процесів, розпізнаванням помилкової первинної структури ДНК та відповідної конформації хроматину. Зроблено цікавий висновок про певні переваги у біотехнологічному застосуванні УФ-С порівняно з рентгенівським опроміненням в зв'язку з затримкою включення індуцибельної форми репарації.

Як четвертий, так і п'ятий розділи завершуються теоретичними узагальненнями одержаних результатів у вигляді схем, які дозволяють пояснити трансформацію короточасних, прямих ушкоджень ДНК у пролонгований стан геномної нестабільності і відкладених у часі метаболічних перебудов.

Останній, 6-тий розділ був посвячений впливу передпосівного УФ-С та іонізуючого опромінення на вихід ефірної олії та вміст хамазулену в ній. Автор роботи підкреслює, що у Відділі, де виконувалась робота, розроблено прості та

ефективні підходи до виділення ефірної олії з малих об'ємів фармацевтичної сировини. Одержані результати виявились дещо несподіваними відносно відсутності стимуляції нагромадження хамазулена у суцвіттях ромашки при передпосівному УФ-С опроміненні. Разом з тим, результати свідчать про ефективність застосування рентгенівського опромінення для стимуляції напрацювання лікарськими рослинами не тільки добре відомих антиоксидантів, але й важливих протизапальних сполук, антиоксидантні властивості яких ще досить мало досліджені.

Новизна представлених експериментальних результатів дослідження

Вперше на основі використання RAPD та ISSR-маркерів ДНК проведено генотипування сортів. На основі молекулярно – генетичних, біохімічних методів з використанням кластерного аналізу виявлено вплив мінісателітного поліморфізму ДНК ряду генотипів ромашки лікарської на чутливість до певного виду опромінення при стимуляції двох важливих для практики показників – продукції фармацевтичних сировини і питомого вмісту фармацевтичних сполук.

Вперше показано, що ключовим механізмом трансформації первинного ураження ДНК при разовому передпосівному опроміненні у довготривалі метаболічні перебудови у рослинних структурах, що не були безпосередньо опромінені. Показано, що ознаки геномної нестабільності, що пов'язують первинні ураження з віддаленими метаболічними наслідками, залежать від мінісателітного поліморфізму досліджених генотипів.

Практичне значення отриманих результатів.

Дисертаційна робота має практичну спрямованість і присвячена дослідженню зв'язку ураження геному за різних типів опромінення із стимуляцією виходу фармацевтичних сполук *Matricaria chamomilla* L.

Головним практичним надбанням роботи є встановлення зв'язку між специфікою дії іонізуючого і УФ-С опромінення на геном клітини і стимуляцією продуктивності фармацевтичної сировини і важливих для медичної практики сполук.

Не менш важливим для практичного застосування різних видів опромінення є виявлення стимуляції рентгенівським опроміненням вмісту головного рослинного антибіотику – хамазулену і розробка методики його виділення з малих порцій фармацевтичної сировини.

Одержані результати, окрім суто практичних результатів, дають внесок у створення теоретичного підґрунтя впровадження радіаційних факторів у діапазоні малих доз у біотехнологію.

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

За матеріалами дисертації опубліковано 5 наукових публікацій, із них 2 статті у виданнях, що входять до міжнародної наукометричної бази даних Scopus (Q1, Q3) із сумарним імпакт- фактором 3,443, 3 – у міжнародних наукових фахових виданнях, 9 публікацій у матеріалах наукових конференцій.

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності

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 дисертаційної роботи

1. Огляд літературних джерел, особливо в частині молекулярно-генетичних досліджень, практично базується на дослідженнях тваринних об'єктів. Дисертаційна робота виконана на рослинах. Чим пояснюється таке протиріччя?

2. На сьогодні відома значна кількість молекулярних маркерів, включаю ДНК-маркери. Чому вся робота базується на використанні саме ISSR та RAPD – маркерів як для генотипування групи сортів і генотипів *Matricaria chamomilla* L., так і при дослідженні ознак геномної нестабільності? В роботі не наведено переконливого обґрунтування цього вибору.

3. В методичній частині не наведено типи ампліфікаторів, на яких проведено дослідження.

4. При описі польових досліджень не згадано тип ґрунту, на якому рослини вирощувались. Цей фактор має суттєвий вплив на продуктивність і метаболічні процеси рослини.

5. В тексті дисертації існують достатньо велика кількість граматичних помилок, зокрема русизми (приклад: «ефірне масло, замість «ефірна олія»).

6. В розділі «Перелік джерел посилання» зустрічаються порушення бібліографічного оформлення використаних джерел.

Загальна оцінка роботи і висновок

В цілому, за зазначеною актуальністю, обсягом наведеного експериментального матеріалу, його новизною, науковим і практичним значенням, рівнем застосованих методологічних підходів дисертаційна робота «Зв'язок ураження геному за різних типів опромінення із стимуляцією утворення фармацевтичних сполук *Matricaria chamomilla* L.» відповідає встановленим вимогам «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 від 12 січня 2022 року № 44, та Вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом МОН України від 12.01.2017 року № 40, які пред'являються до дисертаційних робіт на здобуття ступеня доктора філософії, а її автор, Галич Тарас Вадимович, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

*Кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
відділу генетики клітинних популяцій
Інституту молекулярної біології і генетики
Національної академії наук України*



Оксана ПОРОННІК

Підпис Оксани Пороннік засвідчую.

Вчений секретар

*Інституту молекулярної біології
і генетики НАН України*



Яніна МІЩУК