

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

## РЕЦЕНЗІЯ

офіційного рецензента, кандидата біологічних наук, старшого наукового співробітника відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України  
**Сіндаровської Яни Рудольфівни**

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 дисертаційного дослідження.** Рослини мають виключно важливе значення для існування всього живого на Землі, включаючи величезний вплив на життя людей. Рослини використовують у їжу, для отримання деревини, волокон, фарб тощо, а також для отримання цінних біологічних речовин, які можуть застосовуватись для фармацевтичних цілей. Рослини полину (рід *Artemisia*) здавна відомі своїми лікарськими властивостями, завдяки наявного у них широкого спектру біологічно активних сполук. Проте далеко не всі види даного роду детально досліджені, зокрема вид *A. tilesii* (полин Тілесіуса) майже невивчений, хоча очевидно має бути перспективним науковим об'єктом. Даний вид рослин поширений на півночі та пристосований до екстремальних умов росту, отже, може містити ряд цінних біологічних сполук, в тому числі важливих біофармацевтиків.

Одним із сучасних методів підвищення вмісту вторинних метаболітів (біологічно активних сполук) у рослинних клітинах є створення культури «бородатих» коренів за допомогою ґрунтових бактерій виду (*Rhizobium* (*Agrobacterium*) *rhizogenes*). Культури «бородатих» коренів утримуються у закритих системах у строго контрольованих умовах, що відповідає міжнародним

вимогам належної виробничої практики (good manufacturing practice, GMP), які висуваються до виробництва фармацевтиків, і можуть бути використані у промислових масштабах. Дана робота присвячена створенню колекції з різних ліній культури «бородатих» коренів *A. tilesii* та детальному і різнобічному вивченню цих ліній, з метою отримання флавоноїдовмісних екстрактів з протизапальними та антиоксидантними властивостями. Кожна окрема лінія «бородатих» коренів унікальна за своєю генетичною природою та має свої особливості (наприклад, швидкість росту, вміст біологічних речовин, їх якісний та кількісний склад, і, відповідно, різний ступінь біологічних активностей), а отже, потребує окремого дослідження за різними параметрами для відбору кращих продуцентів цінних речовин.

#### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.**

Дослідження за темою дисертаційної роботи виконувались в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН 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 генноінженерного походження в рослинах» (реєстраційний номер: 0122U001510) та III-1-20 «Цілеспрямовані зміни геному та плейотропні ефекти у генетично трансформованих рослинних системах» (реєстраційний номер: 0120U100849).

**Наукова новизна одержаних результатів** детально викладена у відповідному розділі дисертаційної роботи. Стисло, в роботі уперше було проведено комплексний аналіз різних ліній «бородатих» коренів *A. tilesii*, отриманих за допомогою дикого штаму *A. rhizogenes* та тих, що додатково містили трансгени *ifn-α2b* та *nptII*; порівняно вміст фенольних кислот у зразків різних ліній «бородатих» коренів *A. tilesii*; доведено пряму кореляцію активності генів *rolB* та *rolC* зі швидкістю росту «бородатих» коренів *A. tilesii*, та обернену кореляцію активності гену *PAL* з вмістом флавоноїдів; вивчено вплив фенілаланіну, освітлення та метилжасмонату на різні показники окремих ліній

«бородатих» коренів *A. tilesii*; показано наявність противірусної та протизапальної активностей у екстрактах «бородатих» коренів *A. tilesii*; оптимізовано спосіб отримання флавоноїдовмісних екстрактів із «бородатих» коренів *A. tilesii*.

**Практичне значення одержаних результатів** детально викладене у відповідному розділі дисертаційної роботи. Стисло, окремі лінії «бородатих» коренів можуть бути джерелом цінних біологічно активних сполук; а екстракти, отримані з таких коренів, можуть бути використані як основа для виробництва біофармацевтиків; оптимізація отримання біоактивного флавоноїдовмісного комплексу може посприяти більш ефективному масштабному виробництву біофармацевтичних препаратів з використанням культури «бородатих» коренів.

**Повнота висвітлення результатів дисертаційної роботи у наукових публікаціях** не викликає жодних сумнівів, адже 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, глава монографії та монографія, опубліковані закордоном, та 13 тез доповідей на наукових конференціях.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків, сформульованих у дисертації.** Наукові положення та висновки, сформульовані і викладені у дисертації, ґрунтуються на дослідженнях, проведених дисертанткою, обробці даних та опрацюванні відповідних літературних джерел. Деякі положення/ висновки потребують більш детального обґрунтування чи уточнення (див. розділ Дискусійні положення (запитання) та зауваження до дисертаційної роботи).

**Структура та зміст дисертації, її завершеність та відповідність встановленим вимогам.** Дисертаційна робота структурована згідно з вимогами 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.

Перший розділ присвячений огляду інформації, відомої на сьогоднішній день з літературних джерел, яка стосується дисертаційного питання. Викладені загальні характеристики роду *Artemisia*, зокрема описано ряд вторинних метаболітів, присутніх у рослин цього роду, які мають різні біологічні активності, та специфічні риси та характеристики, притаманні конкретно виду *A. tilesii*. Наведено загальну інформацію про бактерії *Rhizobium* (*Agrobacterium*) *rhizogenes*, їх гени, можливість використання цих бактерій для генетичної трансформації рослин та утворення «культури» бородатих коренів, а також впливу бактеріальної трансформації на синтез вторинних метаболітів у рослинних клітинах.

Другий розділ присвячений детальному і чіткому опису матеріалів та методів, використаних для виконання дисертаційного дослідження. В роботі були використані методи генетичної трансформації рослин полину, культуральні методи роботи, були проведені молекулярно-біологічні та біохімічні аналізи, були використані мікроскопічні методи дослідження, та методи статистичного аналізу.

Третій розділ присвячений саме результатам дисертаційного дослідження, отриманим в ході експериментальної роботи, та їх обговоренню. Описано отримання нових ліній культури «бородатих» коренів та проведено їх молекулярно-біологічний аналіз. Проведено порівняння різних ліній «бородатих» коренів за великою кількістю показників: швидкістю росту в культурі, якісному та кількісному вмісту вторинних метаболітів (флавоноїдів), визначенню їх протизапальної, противірусної та відновлювальної активностей, активністю перенесених бактеріальних генів та деяких власних генів. Визначено вплив умов культивування на ріст «бородатих» коренів. А також описано отримання флавоноїдвмісного комплексу сполук та перевірку його токсичності.

Висновки сформовані відповідно до результатів роботи, проте деякі висновки потребують більш детального обґрунтування чи уточнення (див. розділ Дискусійні положення (запитання) та зауваження до дисертаційної роботи).

**Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності.** У роботі не виявлено ознак академічного плагіату, фабрикації, фальсифікації. Для всіх публікацій у співавторстві чітко зазначено особистий внесок дисертантки. Анотація відображає основний зміст дисертаційної роботи і не містить положень чи ідей, що не наведені в основному тексті.

**Дискусійні положення (запитання) та зауваження до дисертаційної роботи та рукопису.**

#### ЗАГАЛЬНЕ ПИТАННЯ ДО РОБОТИ

1. В результаті вашого дослідження, які «бородаті» корені полину виявились більш перспективним об'єктом: ті, які були отримані в результаті трансформації експлантів диким штамом *R. rhizogenes*, чи ті, які додатково містили ген *ifn-α2b*?

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2. У розділі 2.4 автор наводить температуру плавлення для *rolB* гену – 56°C (продукти ампліфікації 780 та 592 п.н.), *rolC* гену – 56°C, *VirD* гену – 60°C, в той час як оптимальною температурою плавлення (T<sub>m</sub>) для цих пар праймерів є 70°C, 67°C, 65°C та 65°C, відповідно. Зниження T<sub>m</sub> може призводити до хибнопозитивних результатів. Чому були вибрані саме такі T<sub>m</sub>? Відсутні дані про використання пари праймерів для ампліфікації *ifn-α2b* та *nptIII* генів.

3. У розділі 2.5 не зрозуміло корені вирощували на агаризованому чи рідкому живильному середовищі.

4. У розділі 2.7.2 мова іде про «відсоток інгібування», проте не зрозуміло, що саме інгібується. Що використовувалось в якості «контрольної проби» (OD1)?

5. У розділі 2.7.4 у формулі (4) немає пояснення що позначає ΔOD, а розшифрування перемінної V<sub>в</sub> помилково позначене як V<sub>е</sub>.

6. Розділ 2.7.4: чому при вимірюванні активності ферментів каталази та супероксиддисмутази використали різні екстракційні буфери та різні режими центрифугування?

7. У розділах 2.7.5 та 2.7.6: немає жодного посилання при визначенні протизапальної та антивірусної активностей. Ці методики оригінальні?
8. У розділі 2.8 сказано, що «наночастки срібла (AgNPs) були отримані з використанням стандартного методу», але немає посилання на автора(ів) цього метода.
9. Розділ 2.12 та Розділ 3.3.2 названі як «Визначення біобезпечності отриманого флавоноїдовмісного комплексу сполук», хоча в них описується визначення «фітотоксичності» отриманого флавоноїдовмісного комплексу сполук.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

10. Розділ 3.1.2. Ви припускаєте, що довжина кореневих волосків «бородатих» коренів може сприяти покращенню живлення та надавати фізіологічну перевагу. На Рисунку 3.3 показано дві лінії «бородатих» коренів, які сильно різняться за кількістю та довжиною кореневих волосків (№2 та №16), але мають однаковий приріст біомаси (Рисунок 3.5), а вміст флавоноїдів більше у лінії з короткими волосками, ніж з довгими (Рисунок 3.6А). Яку на вашу думку іншу фізіологічну перевагу можуть давати більш розвинені кореневі волоски «бородатих» коренів?
11. Розділ 3.1.3. У «бородатих» коренів лінії №4 вміст флавоноїдів співставний з вмістом флавоноїдів у контрольних коренів, як ви це пояснюєте?
12. Розділ 3.1.3. На Рисунку 3.8 (В) вміст перекису водню в контрольному зразку дорівнює близько 6 мкМ/ г ВМ, в той час як в тексті надана цифра  $22.87 \pm 0.04$  мкмоль / г ВМ. Які з цих даних вірні?
13. Розділ 3.1.3. Ви отримали значні коливання ферментативної активності каталази та СОД між різними лініями коренів. Про що це може свідчити?
14. Розділ 3.1.5. Яка зі сполук, які отримано у коренях полину Телесіуса, на вашу думку, є найбільш цінною? Чи отримання даної сполуки доцільне саме з коренів полину, а не з інших джерел (наприклад, з інших рослин/ культур коренів інших рослин чи шляхом хімічного синтезу)?
15. Розділ 3.1.6.1. У своїй роботі ви визначали протизапальну активність рослинних екстрактів на прикладі інгібування активності рослинної

ліпоксигенази, але як це доводить, що тваринні або людські ліпоксигенази також будуть інгібуватись при дії рослинних екстрактів?

16. Розділ 3.1.6.2. У своїй роботі ви пов'язуєте протівірусну активність екстрактів «бородатих» коренів з вмістом флавоноїдів, проте лінія, яку ви використали для своїх досліджень також містила ген інтерферону людини. Інтерферон відомий своєю антивірусною активністю. Чому на вашу думку, антивірусна активність була пов'язана саме з дією флавоноїдів, а не інтерферону (чи сумісною дією інтерферону та флавоноїдів)?

17. Розділ 3.1.6.2, Рисунок 3.13А. Що ви використали в якості контролю при визначенні цитотоксичності екстрактів: лише буфер чи екстракт коренів у буфері? Чому в контролі ви брали фосфатний буфер (+PMSF, сахароза та SDS), а не етанольний екстракт, як для досліду? Висока цитотоксичність контролів могла бути пов'язана з додаванням PMSF.

18. Розділ 3.1.6.2, Рисунок 3.13Б: як ви пояснюєте, що екстракт №2 мав більшу інгібуючу дію на репродукцію вірусу при більших розведеннях (1:80), ніж при менших (1:10 та 1:20)? Чи ви повторювали даний експеримент?

19. Розділ 3.1.6.3. Ви досліджували кореляцію піків поглинання колоїдних розчинів наночасток срібла з вмістом флавоноїдів. Вміст флавоноїдів контролювався протягом часу експерименту (0, 5 та 9 днів) у вихідних екстрактах?

20. Розділ 3.1.6.3. Чи розраховували ви, яка з ліній дала найбільшу кількість наночасток загалом? Чи якось це співвідносилось із кількістю фенольних сполук?

21. Розділ 3.2.1, Рисунок 3.20Б. На рисунку показано, що вміст флавоноїдів у ліній №10 та №16 вирощених у темряві, без фенілаланіну (зразки №2 та №6, відповідно) був біля 1 мг РЕ/ г ВМ, проте у тесті наведені інші дані (2.3 та 4.74 мг РЕ / г ВМ, відповідно). Які з даних вірні?

22. Розділ 3.2.1, Рисунок 3.20А та Рисунок 3.22А. Чому на вашу думку при повторному експерименті приріст маси коренів лінії №10 був практично таким

самим при вирощуванні у темряві, але при вирощуванні на світлі корені ставали товщими, що призвело до зростання приросту маси більш ніж у 7 разів?

23. Розділ 3.3.2: приріст рослин ряски (за кількістю та масою) достовірно відрізнявся від контролю чи ні?

24. Розділ 3.3.2: у кінці розділу заявляється, що отриманий препарат є біобезпечним та може бути використаний для розробки лікарських засобів, проте нетоксичність препарату для рослин ряски не відкидає можливості токсичності препарату для людини. Для підтвердження біобезпечності препарату для людини потрібно провести інші дослідження з використанням принаймні культур клітин людини.

#### ЗАГАЛЬНІ ЗАУВАЖЕННЯ

25. Автор іноді використовує слово «рослина», говорячи про культуру «бородатих» коренів (корені – це лише один з органів рослини, а не цілісний організм). Автор часто використовує англomовні аббревіатури та назви у тих місцях де їх цілком можна і доцільно замінити українськими аналогами (наприклад, dNTP, RT, chalcone synthase, phenylalanine ammonia-lyase тощо). Іноді одні й ті самі назви позначені то англійськими аббревіатурами, то українськими (наприклад, середовище  $\frac{1}{2}$  MC або  $\frac{1}{2}$  MS). Слід вживати одноманітність позначень скрізь по тексті. Також в тексті рукопису помічена незначна кількість одруківок. Латинські назви (вид, рід) пишуться курсивом (коментар до оформлення списку літератури). Також, зважаючи на офіційну академічну заборону співпраці з російськими науковими установами, варто обмежити цитування робіт, виконаних в установах країни, визнаною законодавством України країною-агресором.

Питання, які виникли під час детального ознайомлення з роботою, ще раз підкреслюють її новизну і значимість, що підтверджено й великою кількістю робіт, опублікованих дисертанткою, а також дають можливість для подальшого поглибленого вивчення поставленої наукової проблеми.

**Загальна оцінка роботи і висновок.** 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 своєю актуальністю, обсягом наведеного експериментального матеріалу, науково-теоретичним рівнем, новизною та практичним значенням, є самостійною закінченою науковою працею, що повністю 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 рецензент:**

Сіндаровська Яна Рудольфівна,  
кандидат біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
відділу генетичної інженерії  
Інституту клітинної біології  
та генетичної інженерії  
Національної академії наук України



Яна СІНДАРОВСЬКА

Підпис	Сіндаровської Я.Р.
Затверджую	Євдокімова Т.В.
Відділ кадрів	