

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

ДРОБОТ Катерини Олександрівни

«Культура трансгенних коренів рослин роду *Artemisia* як джерело біологічно активних сполук»,

подану до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія (091 – Біологія) 09 Біологія

Актуальність теми. Дисертаційна робота К.А.Дробот спрямована на теоретичне обґрунтування і практичне розв'язання актуальної проблеми пошуку ефективних шляхів продукування біологічно активних речовин різного походження в рослинних системах із використанням біотехнологічних підходів.

Дисертаційне дослідження виконане у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України в межах бюджетної теми «Вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетерологічних генів в рослинних системах» (№0115U000025, 2015-2017 р.р.), а також за підтримки гранту Державного фонду фундаментальних досліджень №Ф73/2-2017 «Розробка біотехнологічної платформи для отримання природних рослинних і рекомбінантних сполук з лікувальними властивостями» (№0117U000943, 2017 р).

Як вихідний матеріал для експериментів у дисертаційній роботі використано насіння трьох видів рослин роду полин *Artemisia*, отримане з «Venary» (Німеччина), а саме *A.annua*, *A.vulgaris* та *A.dracunculus*. Для вирішення поставлених задач автор застосовує адекватні методи, серед яких уведення рослин в асептичну культуру, культивування і мікророзмноження в умовах *in vitro*; *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкована генетична трансформація; молекулярно-біологічний аналіз (ПЛР); біохімічні аналізи (визначення вмісту цукрів, артемізініну, флавоноїдів та оцінка протівірусної та антиоксидантної активності екстрактів як вихідних рослин, так і отриманих з них культур «бородатих» коренів); а також методи статистики.

Наукова новизна отриманих результатів. За матеріалами наукових досліджень автором *вперше*:

- розроблено протокол *A.rhizogenes*-опосередкованої трансформації *A.dracunculus* і отримано «бородаті» корені цього виду, що захищено патентом України на корисну модель № 116312 (Спосіб отримання культури

«бородатих» коренів рослин *Artemisia dracunculus* L. / Н.А. Матвеева, **К.О. Дробот**, А.М. Шаховський, В.П. Дуплій – Опубл. 20. 03. 2017)

- отримано «бородаті» корені *A.vulgaris* з геном інтерферону альфа 2b людини;
- кількісно визначено накопичення природних для рослин біологічно активних сполук (артемізиніну, флавоноїдів, цукрів) та порівняно їх вміст у асептичних вихідних рослинах та трансгенних коренях;
- показано, що для екстрактів трансгенних коренів, які мають завдяки трансформації в своєму геномі ген інтерферону людини, характерна противірусна активність;
- створено колекцію «бородатих» коренів *A.annua*, *A.vulgaris*, *A.dracunculus* з підвищеним вмістом артемізиніну, флавоноїдів, фруктанів як перспективних продуцентів цих біологічно активних сполук.

Практичне значення отриманих результатів. Здобувачем оптимізовано протоколи *A.rhizogenes*-опосередкованої трансформації для ініціації культури «бородатих» коренів *A.annua*, *A.vulgaris*, *A.dracunculus*, що може бути використаним для отримання інших для цих рослин ліній-продуцентів біологічно активних сполук. Створена колекція культур «бородатих» коренів може слугувати альтернативним джерелом для продукування артемізиніну, фруктозовмісних цукрів, флавоноїдів з подальшим використанням у фармацевтиці та косметології.

Оцінка наукової та літературної якості матеріалу і стилю дисертації та автореферату. Дисертація написана у традиційній формі і оформлена відповідно до вимог ДАК МОН України. Повний обсяг дисертації – 182 с. комп'ютерного друку, обсяг основного тексту – 133 с. Перелік використаних джерел налічує 459 публікацій, з них 438 англомовні. Слід зауважити, що обсяг цитованої літератури виглядає невиправдано надмірним: лише 209 публікацій (46%) висвітлюють досягнення останніх 10 років.

Дисертація містить анотації українською та англійською мовами, перелік публікацій за темою дисертації, перелік умовних скорочень, вступ, огляд літератури, розділ «Матеріали і методи досліджень» та розділ «Результати дослідження та їх обговорення», а також узагальнення, висновки та перелік використаних джерел. Позитивним є наявність короткого узагальнення для кожного експериментального підрозділу. Робота ілюстрована 21 рисунком та 8 таблицями, які допомагають кращому сприйняттю отриманих автором

результатів. На мій погляд, ілюстративного матеріалу (діаграм і таблиць) не вистачає, експериментальні дані з морфо-фізіологічних особливостей трансгенних коренів (с.80, 93), вмісту артемізиніну (с. 111-114) подані лише описово, інколи навіть без цифр (с.80 -...найменшу кількість пагонів утворювали бруньки *A. vulgaris*, в той час як бруньки *A. dracuncululus* та *A. annua* були *більш чутливими* до дії екзогенних регуляторів росту та утворювали *в 3 рази більше пагонів* у порівнянні з *A. vulgaris*; с. 93 - Трансгенні корені *A.dracuncululus* були *коротшими* за корені *A.vulgaris*), а це ускладнює порівняння і можливість аналізу. Крім того, автор робить посилання на свої ілюстрації іноді некоректно: с.126 містить посилання на рис. 5.1, 5.3, 5.4, які відсутні у тексті дисертації (мабуть, це рис. 3.13, 3.15, 3.16).

Основним недоліком роботи вважаю неконкретність викладення матеріалу: немає позначення трансгенних ліній як окремих трансформаційних подій, лише 1, 2, 3... – які гени, які конструкції? Як в дисертації, так і в статтях автора відсутні дані про кількість трансгенних ліній, отриманих взагалі, і тих, які вивчались за різними параметрами. Виключенням є розшифровка ліній в статті «Вплив *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації на вміст біологічно активних сполук у трансгенних коренях *Artemisia vulgaris* / **К.О. Дробот**, А.М. Остапчук, В.П. Дуплій, Н.А. Матвєєва // Фізіологія рослин та генетика. – 2016. – Т. 48, № 5. – С. 450-455». Не ясно, де опубліковано отримання рослин після трансформації з вектором рСВ124 – є посилання на статтю *Дробот К.О., Шаховський А.М., Матвєєва Н.А.* Отримання культури «бородатих» коренів рослин полину звичайного з використанням *Agrobacterium rhizogenes* з геном *ifn- α2b* людини // Фактори експериментальної еволюції організмів. — К.: Логос, 2015. — 17. —С. 145—147, але там є інформація лише про трансформацію з використанням А4 і рСВ161.

Крім того, автор робить узагальнення, які суперечать один одному. Наприклад, «...це може бути пов'язано зі *значною швидкістю росту культури «бородатих» коренів, що може призводити до зменшення швидкості накопичення фруктанів.*» (с.103) та «*Швидкий приріст біомаси може дозволити отримати більшу кількість БАС*» (с.94). Фруктани не є БАС? А також: «Для зміни природних якостей рослин застосовують *методи генетичної інженерії, які дозволяють керувати впливати на геном рослин. Генетична трансформація за допомогою Agrobacterium rhizogenes належить до таких методів.*» (с.18) та «*При трансформуванні ядерної ДНК контрольоване вбудовування трансгенів є*

неможливим.» (с.96) і «Неспецифічний вплив генетичної трансформації некеровано впливав на клітинний метаболізм та змінював природну здатність представників *Artemisia* spp до накопичення фруктозовмісних цукрів» (с.105). Так керовано чи некеровано? І чи відомо автору про методи редагування геному?

Автор робить узагальнення, для яких у нього немає фактичних даних. У багатьох випадках (с.103, 104, 105, 106, 109, 111, 113, 114, 119, 120, 121) йдеться про «трансформацію взагалі», хоча автор вивчав *A. rhizogenes*-опосередковану трансформацію.

Іноді, навпаки, автор не бере до уваги факти, які є очевидними. Наприклад, “Кількість фруктанів не залежала від використаних агробактерій – дикого штаму A4, або *A. rhizogenes* з вектором pCB161 або pCB124. Таким чином, виявлені відмінності не були індуковані наявністю перенесених генів *ifn-a2b* та *nptII*, а, скоріш за все, стали результатом самого процесу генетичної трансформації з використанням *A. rhizogenes*.” (с.104). Так впливає процес чи перенесений у всіх випадках ген *rolB*?

У дисертації, як і в авторефераті, аналіз противірусної активності відображено некоректно. На відповідних рисунках 3.20 (дисертація) та 10 (автореферат) на діаграмах відсутні дані щодо контрольних рослин і стандарту, а словами вони охарактеризовані.

Текст містить велику кількість друкарських, стилістичних, орфографічних, пунктуаційних помилок, спостерігається невідповідність опису діаграм їхнім реальним значенням (рис. 3.19).

У вступі дисертант вказує на актуальність ініціації “бородатих коренів” лікарських рослин на прикладі представників роду полин *Artemisia* як джерела біологічно активних сполук за допомогою *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації.

Огляд літератури включає п’ять підрозділів, у яких автором розглянуто досягнення біотехнології у створенні трансгенних коренів різних видів рослин як продуцентів сполук фармацевтичного спрямування, охарактеризовано біотехнологію рослин як галузь знань і викладено історію її розвитку, розглянуто особливості різних способів генетичної трансформації. Крім того, подано характеристику біологічно активних речовин, накопичення яких автор потім вивчав, особливості їх синтезу в рослинах та інших системах та можливості інтенсифікації цих процесів. Позитивним, на мій погляд, є

узагальнення матеріалу у вигляді таблиць, а саме: “Гени, які використовують для генетичної інженерії *A. annua* L. з метою отримання трансгенних рослин та «бородатих» коренів з високим вмістом артемізиніну”, “Біологічно активні сполуки рослинного походження, синтезовані у «бородатих» коренях”, “Рекомбінантні біологічно активні сполуки, синтезовані у «бородатих» коренях”.

Наприкінці огляду літератури здобувачем зроблено підсумок і обґрунтовано необхідність проведення досліджень, яким присвячена дисертаційна робота.

У розділі 2 «Матеріали і методи досліджень» наведено відомості щодо вихідного рослинного матеріалу трьох видів полину, методик уведення в культуру *in vitro* та мікроклонального розмноження для *A. annua*, *A. vulgaris* і *A. dracuncululus*, а також особливостей *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації цих видів. Крім того, охарактеризовано умови проведення ПЛР на підтвердження введення чужорідних генів до рослинної ДНК, наведено методики вимірювання вмісту цукрів (глюкоза, сахароза, галактоза, манітол, фруктани, інулін), артемізиніну, флавоноїдів, а також протоколи визначення антиоксидантної (з використанням DPPH⁺ радикала) і противірусної активностей.

Наведені у дисертаційній роботі «Результати дослідження та їх обговорення» викладені у розділі 3.

У межах підрозділу 3.1 «Культивування *Artemisia* spp. *in vitro* та ініціювання культури «бородатих» коренів» автором наведено дані щодо експериментально підібраних умов стерилізації насіння трьох видів полину та мікророзмноження отриманих рослин, продукування трансгенних коренів і підтвердження їх трансгенної природи.

У підрозділі 3.2 «Дослідження впливу генетичної трансформації на морфо-фізіологічні параметри «бородатих» коренів» описано фенотипові особливості трансгенних коренів рослин полину різних видів, наведено результати щодо швидкості їх росту та впливу на цей показник стимуляторів росту (індолілоцтової та індоділмасляної кислот, а також комплексних препаратів фірми «Агробіотех» Стімпо та Емістим С). Цікаво, що для комплексних препаратів біологічного походження не виявлено стимулюючої дії на ріст коренів на противагу індивідуальним ауксином за виключенням однієї лінії з дуже повільним ростом.

Серед недоліків викладення матеріалу слід вказати на невідповідність підпису до рис. 3.9 і опису його в тексті. Як стає відомим з підпису до рис.3.9 (Рис. 3.9. Зовнішній вигляд культивованих *in vitro* «бородатих» коренів полину: А – *A. vulgaris*, Б – *A. annua*, В – *A. dracuncululus*.), він ілюструє різницю у зовнішньому вигляді коренів різних видів полину. А при описі в тексті читаємо таке: «Було відзначено морфологічні відмінності серед *різних трансгенних ліній одного виду*. Вони відрізнялися за кольором, ступенем обводнення, товщиною коренів та ступенем галуження (Рис. 3.9)».

Підрозділ 3.3 містить величезний масив результатів щодо вмісту біологічно активних сполук у «бородатих» коренях *A.vulgaris*, *A. annua*, *A. dracuncululus* та біологічної активності їхніх екстрактів (антиоксидантної або противірусної). Це найбільш цікавий, на мій погляд, підрозділ роботи. В ньому мають міститися головні здобутки дисертанта. Автор спрямував титанічні зусилля на характеристику мінімум 9-ти ліній коренів за 10 біохімічними параметрами.

У підрозділі «**3.3.1. Визначення вмісту поліфруктанів**» визначено видові відмінності у накопиченні цих сполук у «бородатих» коренях *A.vulgaris*, *A.annua* та *A.dracuncululus* і пов'язано ці особливості із швидкістю росту культур: для *A.vulgaris* зафіксований найшвидший ріст трансгенних коренів і найменший вміст фруктанів у порівнянні з нетрансформованими коренями; протилежна картина задетектована для *A.dracuncululus*.

Серед недоліків слід вказати на розбіжності у викладенні матеріалів у дисертації та у статті автора. Так, с. 104 містить узагальнення: «Кількість фруктанів не залежала від використаних агробактерій – дикого штаму А4, або *A. rhizogenes* з вектором рСВ161 або рСВ124.» А в оригінальній і дуже цікавій статті «Порівняльна оцінка вмісту поліфруктанів у бородатих коренях та рослинах роду *Artemisia* / В.П. Дуплій, **К.О. Дробот**, Я.І. Ратушняк, Н.А. Матвеева // Фізіологія рослин та генетика – 2017. – Т.49, №4. – С. 321-327» показано (рис.1, рис.2б), що вміст фруктанів у трансгенних коренях залежить від вектора, використаного для трансформації, а саме зменшується у такому порядку: рСВ161 > рСВ124 > А4.

У підрозділі «**3.3.2. Визначення складу цукрів**» наведено результати, які були отримані здобувачем вперше, щодо вмісту сахарози, глюкози, фруктози, галактози, манітолу в *in vitro* культивованих рослинах та в «бородатих» коренях рослин *A.vulgaris* і *A.dracuncululus*. Цікаво, що для однієї з

ліній трансгенних коренів *A.dracunculus* було характерним високе (майже 50 мг/г сухої маси) накопичення фруктози. Вміст фруктози у нетрансгенних коренях асептичних рослин виявився втричі меншим в порівнянні з цією трансгенною лінією коренів, хоча нетрансформовані пагони *A.dracunculus* накопичували фруктозу в більшій кількості (60 мг/г сухої маси).

У підрозділі **«3.3.3. Визначення вмісту інуліну»** проаналізовано отримані результати щодо вмісту інуліну у «бородатих» коренях в порівнянні з таким у нетрансгенних коренях. Логічніше було б розглянути цей матеріал в підрозділі, який стосується фруктанів, тому що, як справедливо зауважує здобувач, інулін – це фруктан. На жаль, складно скласти уявлення про біохімічні особливості трансгенних ліній, тому що невідомо, чи ті самі лінії аналізувались за вмістом фруктанів, цукрів, інуліну. Якщо так, то лінія *A.vulgaris* 1 на рис. 3.13 містить 50 мг/г сухої маси фруктанів та серед них 60 мг/г сухої маси інуліну (рис.3.16).

Підрозділ **3.3.4** присвячений результатам **визначення вмісту артемізиніну** в рослинних тканинах. Вивчення цього показника є дуже важливим, тому що представники роду *Artemisia* здавна відомі як рослини, які використовуються для боротьби з малярією, і саме артемізинін є сполукою з антималярійними властивостями. На жаль, як ілюстративний матеріал автор наводить лише хроматограму контрольної та однієї лінії трансгенних коренів *A.vulgaris* як результат високоефективної рідинної хроматографії. Дані щодо трьох видів полину надані описово, що ускладнює сприйняття і аналіз матеріалу. Бажано б виокремити лінії, для яких показано підвищення вмісту артемізиніну.

У підрозділі **3.3.5. «Визначення вмісту флавоноїдів у трансформованих коренях»** зафіксовано збільшення вмісту флавоноїдів як сполук з фармакологічними (антиоксидантними, протипухлинними та протизапальними) властивостями в усіх «бородатих» коренях *A.annua* та *A.vulgaris* в порівнянні з нетрансформованими коренями, однак ситуація була протилежною у випадку *A.dracunculus*.

Підрозділ 3.3.6. присвячений результатам визначення антиоксидантної активності, на основі яких автором справедливо робиться висновок, що культура «бородатих» коренів рослин роду *Artemisia* може виступати в якості джерела природних антиоксидантів рослинного

походження. Однак слід зауважити про невідповідність опису діаграми на рис. 3.19 реальним значенням: «...екстракт трансгенної лінії №1, отриманої за допомогою дикого штаму А4, проявляв протирадикальну активність у 2,4 рази вищу, ніж екстракт нетрансформованих коренів цього виду, і складав $93,2 \pm 5\%$ (при $39,4 \pm 6,4\%$ у екстракті нетрансформованих коренів *A. annua*)...», хоча на діаграмі це лінія №2. В той же час, позитивним є конкретизація в цьому випадку біологічної суті трансгенної лінії.

У підрозділі 3.3.7. показано як міжвидові відмінності у противірусній активності, так і відмінності серед екстрактів різних трансгенних ліній в межах одного виду. Нелогічним, на мій погляд, виглядає оцінювання противірусної активності тільки у коренів з геном інтерферону. Можливо, раптом, через факт трансформації відбулися б зміни і за цим параметром?

У підрозділі «3.4. Вибір ліній-продуцентів біологічно активних сполук» надається інформація щодо кращих отриманих ліній трансгенних коренів. Характеризуючи такі лінії-продуценти біологічно активних сполук, автор зауважує, що вони мають противірусну активність (с.127). Виходить, що кращі отримані таки після введення гена інтерферону? З іншого боку, для *A. dracunculoides* не вдалось отримати лінії з геном інтерферону, а противірусну активність вивчали лише у таких ліній. Звідки тоді «...Екстракти з досліджуваних ліній коренів проявляли антиоксидантну та противірусну активності (с.127)»?

Узагальнення. Наведений у роботі підсумок дозволяє виокремити найважливіші теоретичні та практичні результати дисертаційної роботи.

Висновки, які зроблені здобувачем, відповідають меті і завданням дисертації та обґрунтовані експериментальним матеріалом.

Автореферат у цілому відповідає змісту дисертації.

Повнота викладення основного змісту дисертації в опублікованих працях у наукових виданнях, затверджених ДАК МОН України. Основні положення дисертаційної роботи відображені у 16 публікаціях. Серед них 9 статей, причому одна стаття опублікована в журналі, що індексується в Scopus і Web of Science, а 5 – у провідних фахових виданнях. Крім того, отримано патент на корисну модель та опубліковано 6 тез доповідей у збірниках вітчизняних та закордонних конференцій.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням, яке містить вирішення завдання щодо отримання за допомогою *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації культур «бородатих коренів» рослин трьох видів полину як потенційних джерел біологічно активних сполук та їх морфо-фізіологічної, біохімічної та молекулярно-генетичної характеристики.

Незважаючи на вказані недоліки, вважаю, що робота «Культура трансгенних коренів рослин роду *Artemisia* як джерело біологічно активних сполук» за своєю актуальністю, обсягом виконаних досліджень, їх теоретичним і практичним значенням відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 щодо кандидатських дисертацій, а її автор, Дробот Катерина Олександрівна, заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20. – біотехнологія.

Доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
провідний науковий співробітник
відділу клітинної біології та біотехнології
ДУ «Інститут харчової біотехнології
та геноміки НАН України»

 Л.О. Сахно

