

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Шведовой Анастасии Николаевны «Водное растение *Wolffia arrhiza* в качестве продуцента терапевтических рекомбинантных белков», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология

В своей диссертационной работе Шведова Анастасия Николаевна изучает возможность использования ряски вида *Wolffia arrhiza* в качестве экспрессионной системы для наработки рекомбинантных белков и осуществляет экспрессию генов двух терапевтических белков, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека и гирудина.

Актуальность работы. В исследованиях была оптимизирована процедура трансформации ряски и убедительно продемонстрирована перспективность использования этого растения для получения биотехнологически ценных соединений, что свидетельствует о высокой практической значимости представленной работы. Растущая потребность современного общества в новых методах получения рекомбинантных белков для медицины и промышленности определяет актуальность данного направления исследований, готовящих теоретическую и методологическую базу для биофарминга.

Научная новизна и оригинальность представленной работы не вызывают сомнений. В лаборатории автора диссертации впервые получены растения *Wolffia arrhiza*, экспрессирующие гены гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека и гирудина, при этом экспрессия перенесенных генов приводит к накоплению целевых белков.

Цели и задачи диссертационной работы ясно сформулированы, все задачи работы полностью решены, выводы диссертации обоснованы.

Достоверность полученных результатов подтверждена статистической обработкой данных. Описание всех результатов работы сопровождается графиками, таблицами и фотографиями электрофореграмм и блотов.

Общая характеристика работы.

Диссертационная работа оформлена традиционно, изложена на 116 страницах, включает 22 рисунка и пять таблиц. Список процитированной литературы содержит 188 ссылок на статьи и сайты в интернете. Все ссылки уместны. Литературный обзор написан хорошо, лаконичен, сфокусирован на современных методах трансформации растений и получения рекомбинантных белков, а также включает описание особенностей культивирования *Wolffia arrhiza* и основных свойств и характеристик двух белков, гены которых в ходе работы над диссертацией были перенесены в *Wolffia arrhiza*.

В работе применялись методы биоинформатики, молекулярной биологии, биохимии, микробиологии. Все методы описаны в разделе «Материалы и методы» достаточно подробно.

Глава «Результаты и Обсуждение» включает несколько подглав, описывающих процесс оптимизации метода трансформации *W. arrhiza*, получение и анализ трансформированных растений, наработку целевых белков и оценку их накопления в тканях растения. Текст характеризует четкое описание хода исследования. Необходимо отметить хороший дизайн экспериментов, использование всех необходимых контролей и применение статистического анализа для обработки полученных данных.

Значительная часть работы посвящена оптимизации трансформации вольфии (ряски), выбран подходящий агробактериальный штамм ЕНА105, подобраны условия подготовки агробактерий для использования в трансформации растений, время кокультивации, а также необходимые концентрации гормонов в среде культивирования эксплантов при трансформации и для регенерации растений. В результате проведенной экспериментальной работы Шведовой Анастасии Николаевне удалось значительно повысить накопление гирудина в клетках ряски и добиться накопления гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека в

концентрациях, приемлемых для решения биотехнологических задач. С помощью саузерн-блот анализа было показано, что поликопийность инсерций перенесенных генов в геном вольфии приводит к более высоким уровням накопления целевых белков.

Научное содержание диссертационной работы оцениваю высоко, экспериментальные задачи выполнены на высоком уровне, данные хорошо организованы и представлены.

По содержанию работы возникло несколько вопросов и замечаний:

- При отборе трансгенных линий ряски, экспрессирующих ген гирудина, для анализов «из пяти изолятов отбирался один, сформировавший наибольшую биомассу». Возможно, не следовало исключать из анализа медленно растущие изоляты, так как существует вероятность того, что их медленный рост был связан с накоплением гирудина.

- В работе не описано, как осуществлялась наработка плазмиды для трансформации агробактерий.

- В диссертации не представлен Вестерн-блот белков трансгенных линий вольфии, экспрессирующих ген гирудина, хотя он упоминается в тексте: «Гирудин в трансгенной вольфии мигрировал в геле с той же скоростью, что и контрольный белок...».

В тексте диссертации много ошибок технического характера, пропущены знаки препинания. Необходимо отметить следующие замечания к тексту:

Стр. 7 «Большинство видов содержат 15– 45% белка», - Нужно было добавить «в расчете на сухой/сырой вес».

Стр. 51 Сокращение названия этилендиаминтетрауксусной кислоты указано как «ЭДТУ», а далее в тексте используется общепринятое сокращение «ЭДТА».

Стр. 55 «Для переноса белков в жидкий буфер использовали ячейку Mini Trans-Blot® Cell (BioRad, США)». Наверно, должно быть «для переноса белков на мембрану».

Стр. 84 «В таком случае произошло бы замолкание и мы бы не увидели экспрессию наших целевых белков». – Следовало написать «замалчивание генов», и не следует использовать словосочетание «экспрессия белков», так как белок накапливается вследствие экспрессии генов. Можно было бы написать: «...мы бы не увидели накопление целевых белков».

Лучше было бы заменить словосочетания «наработки белка в среду» или «его локализация в жидкой среде» на другие, например, «секреция/выделение белка в среду выращивания».

Неудачной является фраза «Данный пептид легче в воспроизводстве».

Все указанные недочеты стилистического характера несколько не снижают ценности рассматриваемой диссертационной работы. Диссертационная работа Шведовой А.Н. представляет собой совокупность оригинальных исследований, соответствующих современному уровню науки, результаты исследований представляют значительный практический интерес. Основные научные результаты, включенные в диссертационную работу, опубликованы в журналах из списка ВАК.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах. По теме диссертационной работе автором опубликовано 3 работы в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК. Основные результаты работы изложены в опубликованных статьях.

Заключение

Работа Шведовой А.Н., посвященная изучению возможности продуцирования ценных белков с помощью удобной и перспективной модели на основе ряски, имеет практическую значимость, а результаты обсуждаемых исследований могут найти применение в разработке новых методов получения терапевтических соединений. Объем, качество и актуальность выполненных исследований полностью соответствуют требованиям «Положения о

присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям, а также паспорту специальности 1.5.6 – Биотехнология. На основании вышесказанного Шведова Анастасия Николаевна, несомненно, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Ведущий научный сотрудник лаборатории
фотосинтетического окисления воды
Института фундаментальных проблем биологии РАН,
доктор биологических наук
(специальность – 03.01.05. (1.5.21.) физиология и биохимия растений)

« 13 » октябрь 2025 г.



Татьяна Викторовна Савченко

Контактные данные:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Почтовый адрес: 142290, гор. Пушкино, ул. Институтская, д. 2. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук.

Телефон: +7 (496)773-37-18.

Адрес электронной почты: savchenko_t@rambler.ru

Подпись Т.В. Савченко заверяю

