

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертацию 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

Диссертация Шведовой А.Н. посвящена получению стабильных трансгенных линий водного растения вольфии бескорневой, продуцирующих гирудин и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. Получение растений-продуцентов рекомбинантных терапевтических белков, несомненно, является очень перспективным направлением биотехнологии. Продукция рекомбинантных белков в вольфии – миниатюрном растении семейства рясковых – является не только оригинальным, но и весьма эффективным решением в связи с такими особенностями этого вида, как быстрый рост, малые площади возделывания (в том числе возможность выращивания в биореакторах на производстве), высокая по сравнению с большинством других растений продукция белка, а также способность синтезировать много белков на экспорт, выбрасывая их в окружающую среду.

Все эти резоны автор излагает во Введении, где также отмечает наличие научного задела по направлению – в частности, разработанную систему агробактериальной трансформации вольфии. Здесь же Анастасия Николаевна формулирует цели и задачи исследования и положения, выносимые на защиту. К последним у оппонента имеется замечание: на мой взгляд, пятое положение не несет в себе конкретной информации и представляет собой «вывод из положений 2, 3 и 4» (которые как раз информативны и говорят об успешности и практической значимости проведенного исследования). Недостатком Введения также является отсутствие списка работ, опубликованных по теме диссертации: автор утверждает, что их 12, из которых 3 – статьи в журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных ВАК. Как оппоненту, мне хотелось бы видеть, что из полученных результатов опубликовано.

В литературном обзоре диссертантка повествует как о растениях-продуцентах рекомбинантных белков в целом, так и об использовании с этими целями представителей семейства рясковых, а также о том, что такое ГКСФ и гирудин, и с какими целями эти белки применяются. Мне очень понравился экскурс в биологию рясковых, особенности которой делают из этих маленьких растений перспективных продуцентов терапевтических белков, а также очень информативная таблица 2, в которой перечисляются работы по генетической трансформации рясковых. Вместе с тем, к Обзору литературы также есть замечания: на

взгляд оппонента, он мог быть лучше структурирован. Так, подразделы 1.2.1, 1.2.2. и 1.2.3 содержат много повторяющейся из раздела в раздел информации и говорят, по сути, об одном и том же – примерах и преимуществах растительных продуцентов. Таблица 1 «Допущенные к использованию вакцины» (название, кстати, слишком общее) перечисляет примеры наработки вакцин в растениях-продуцентах, хотя, на взгляд оппонента, более близка к теме диссертации была бы аналогичная таблица о растениях-продуцентах гирудина и ГКСФ. Также в разделе встречаются опечатки, ряд стилистических ошибок и запутанных фраз (например, «На базе томата впервые была создана эффективная вакцина против острого респираторного синдрома, атипичной пневмонии, вызванной коронавирусом. Листья, стебли, плоды и другие ткани обладают способностью экспрессировать белки СТ-В из токсина *Vibrio cholera*» или «элемент Т-ДНК кодирует растительные гормоны»).

Экспериментальная часть занимает ровно половину изложенной диссертационной работы и включает в себя разделы «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение» и «Заключение».

Материалы и методы исследования описаны очень подробно и не вызывают больших вопросов у оппонента. Небольшие замечания имеются к оформлению раздела:

- 1) нет ссылки на приведенный метод выделения ДНК по Эдвардсу,
- 2) в подразделе 2.3.2 описано выделение белков и Вестерн-блот анализ отдельно для ГКСФ и гирудина – двумя почти идентичными блоками. Не следует ли объединить эти две части, если методологических различий не было?
- 3) на картах векторов (рис. 8 и 9) зачем-то отмечены сайты рестрикции, которые не использовались,
- 4) автор не ссылается на работы исследователей, предоставивших вектора для трансформации (наверняка это где-то опубликовано?),
- 5) подраздел 2.6.1. слишком подробно объясняет принципы использования статистического метода (критерия Дункана), хотя ссылка на статью о нем дана.

Результаты исследования исчерпывающе описаны, подробно проиллюстрированы и отражают большой объем успешно выполненной работы. Исследовательница провела оптимизацию методики агробактериальной трансформации вольфии бескорневой, получила стабильные линии вольфии, продуцирующие гирудин и ГКСФ, провела их генотипирование и проанализировала содержание продуцируемых целевых белков. Это очень ценные результаты, их достоверность и практическая значимость не вызывает сомнений. Тем не менее, к разделу имеются вопросы и замечания по оформлению:

1) рисунки 10-12 (Эффективность транзientной экспрессии гена *uidA* в тканях эксплантов вольфии с разными агробактериальными штаммами) следовало бы объединить в один, с подпунктами а, б, в.

2) рисунок 15 (Электрофореграммы) - почему при ПЦР с геном гирудина наблюдалась разная длина продуктов? Где данные ПЦР растений с геном ГКСФ? Какой маркер молекулярного веса использовали, какой длине фрагмента соответствует каждая его полоса?

3) в таблице 3 приведен дисперсионный анализ результатов эксперимента по изучению влияния 2,4-D и ВА на эффективность трансформации вольфии. При этом в тексте не делается никакого вывода об оптимальной концентрации гормонов.

4) данные по анализу трансгенных растений следовало бы объединить «под одной крышей», иначе в одном разделе написано про ПЦР, в другом, сильно дальше, про содержание целевого белка, дальше про Саузерн и т.д. Это усложняет понимание данных.

5) названия разделов из серии «Анализ растений, трансформированных плазмидой pSamGCSF» неудачны, ведь дело не в векторах, а в целевых генах – на них и следует сделать акцент в названии.

6) представление данных ИФА по гирудину и ГКСФ надо как-то унифицировать (по одному белку приведена диаграмма с ошибками среднего, по другому белку – без ошибок, где-то зеленая масса, где-то сырая и т.д.).

В работе сделаны 5 выводов по результатам диссертации. Выводы являются информативными и обоснованными, за исключением вывода 5, который, скорее, представляет собой итоговую часть заключения. Немного замечаний имеется к формулировкам выводов:

1) Вывод 1: Оптимизация условий трансформации эксплантов вольфии бескорневой позволила повысить эффективность трансформации вольфии в 2 раза.

В 2 раза по сравнению с чем?

2) Вывод 2: Применение усовершенствованного протокола агробактериальной трансформации позволило получить трансгенные линии вольфии экспрессирующие рекомбинантный терапевтический белок такой как дисульфатогирудин-1, экспрессирующийся в линиях в диапазоне 534,55-775,45 нг/г сырой массы продуцента.

Выражение «Такой как» - не годится для выводов, повторение однокоренных слов (экспрессирующие и экспрессирующийся) в одном предложении тоже не очень хорошо.

3) В выводе 3 также имеется этот повтор («экспрессирующие – экспрессирующийся»)

Следует подчеркнуть, что сделанные оппонентом замечания не снижают ценность исследования, а имеют отношение к оформлению диссертации. Крайне желательно, чтобы они были учтены в дальнейшем при подготовке публикаций.

По актуальности проблемы, уровню использованных методов, объему обработанного материала, научной новизне и практической значимости полученных результатов исследование А.Н. Шведовой соответствует требованиям п. 9 “Положения о порядке присуждения ученых степеней”, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям, выдвигаемым на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор заслуживает присвоения искомой степени по специальности 1.5.6 – биотехнология.

Я, Додуева Ирина Евгеньевна, согласна на включение в аттестационное дело и дальнейшую обработку моих персональных данных, необходимых для процедуры защиты диссертации Шведовой Анастасии Николаевны, исходя из нормативных документов Правительства РФ, Минобрнауки РФ и ВАК при Минобрнауки РФ, в том числе на размещение их в сети Интернет на сайте ФГБУН НБС- ННЦ РАН, на сайте ВАК, в единой информационной системе.

Додуева Ирина Евгеньевна,
кандидат биологических наук (специальность 03.02.07 - Генетика)
Доцент кафедры генетики и биотехнологии,
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»,
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9
Телефон + 7 (812) 36 36 105
e-mail spbu@spbu.ru
e-mail автора отзыва: Wildtype@yandex.ru

«22» октября 2025 г.

ЛИЧНУЮ ПОДПИСЬ

Додуевой И. Е.

ЗАВЕРЯЮ



ЗАМЕСТИТЕЛЬ НАЧАЛЬНИКА
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ СПбГУ
Н. К. КОРЕЛЬСКАЯ

22.10.25