

фармацевтической биоинженерии.

Таким образом, диссертационная работа Шведовой А.Н., посвященная усовершенствованию протоколов агробактериальной трансформации вольфии бескорневой, разработке трансгенных линий и подтверждению перспективности использования *Wolffia arrhiza* в качестве платформы для синтеза терапевтических белков, безусловно, является своевременной и актуальной.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЙ И РЕЗУЛЬТАТОВ.

Научная новизна представленной диссертации не вызывает сомнений. Автор впервые успешно продемонстрировала возможности использования *Wolffia arrhiza* в качестве платформы для экспрессии таких терапевтических белков, как гирудин и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. Значимость научных теорий и выводов, изложенных в работе, является неоспоримой. Диссертация представляет собой исследование высокой комплексности, основанное на сочетании классических и современных методов молекулярной биологии и биотехнологии. Представленные результаты подтверждаются не только сложностью самой работы, но и обширным набором экспериментов, выполненных на различных стадиях исследования, а также адекватной статистической обработкой собранной информации.

Научные положения и заключения базируются на изучении широкого спектра фундаментальных и прикладных исследований, выполненных как отечественными, так и зарубежными учеными. Полученные данные систематизированы и сопоставлены с уже опубликованными работами других исследователей. Заключение диссертации соответствует поставленным целям и совпадает с главными выводами проведенного исследования.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка используемой литературы. Работа изложена на 116 страницах машинописного текста, содержит 5 таблиц и 22 рисунка. Библиографический список включает 186 источников, из них 174 на иностранном языке.

Во введении диссертационной работы обосновывается актуальность и новизна темы исследования, описывается степень ее разработанности. Цель и задачи исследования, логично связанные с целью, четко сформулированы. Обоснованность выдвигаемых на

защиту положений не вызывает сомнений. Результаты работы получены с использованием современных методов молекулярной биологии и генетической инженерии. Для оценки достоверности полученных данных применены адекватные статистические методы. Достоверность полученных результатов подтверждается 3 публикациями в ведущих зарубежных и отечественных журналах.

В обзоре литературы подробно описаны результаты современных исследований в области диссертационной работы. Обзор литературы последовательный, логичный, структурированный. В данной главе представлена информация об использовании растений в качестве продуцентов рекомбинантных белков, а также об использовании представителей семейства *Lemnaceae* в биофарминге, описаны работы по генетической трансформации *Lemnaceae*. Отдельное внимание уделяется вольфии бескорневой, ее культивированию, описываются ее преимущества, которые и имели значение при выборе данного растения в качестве платформы. Отдельно речь заходит о съедобных вакцинах на основе рясковых. Подробно описана роль и значимость для современной медицины двух белков, которые были экспрессированы в работе, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (ГКСФ) и гирудина. Описан агробактериальный метод трансформации растений. Описаны биореакторы и особенности культивирования рясковых. Следует отметить цитирование в тексте значительного количества современных литературных источников и новейших данных, датированных 2010-2025 гг., что подчеркивает исключительную актуальность и повышенную концентрацию внимания научного сообщества на исследования, посвященные возможности использования биореакторов для растительного биофарминга.

Представленные в обзоре литературы сведения необходимы и достаточны для понимания сути диссертационной работы.

В экспериментальной части работы – главе 2, посвященной материалам и методам, содержится подробное описание объекта исследования, материалов, методов. Данный раздел написан очень тщательно, описаны все методики, которые были использованы в работе. Автор привел детальную информацию по использованным в работе агробактериальным штаммам и бинарным векторам, реагентам, методикам (молекулярно-генетический анализ трансгенных растений, количественный анализ белка, агробактериальная трансформация) и статистической обработке данных. Описание методик сопровождается ссылками на первоисточники, указана использованная материально-техническая база.

Глава “Результаты и обсуждение” содержит 6 разделов. Первый раздел посвящен оптимизации условий агробактериальной трансформации *Wolffia arrhiza*. Были использованы 3 агробактериальных штамма (EHA105, CBE21, Agl10) в разных

концентрациях (OD₆₀₀ от 0,1 до 1,0). По результатам исследования для дальнейшей работы был выбран агробактериальный штамм ЕНА 105 в концентрации OD₆₀₀ 0,4 со временем кокультивирования эксплантов с агробактерией 72 часа. В следующем разделе изучалось влияние регуляторов роста на эффективность трансформации вольфии. Было задействовано 25 вариантов комбинаций регуляторов роста. Были подобраны оптимальные условия. В результате эффективность трансформации *Wolffia arrhiza* была повышена с 0,2% до 0,4-0,5% относительно опубликованных ранее протоколов. Третий раздел результатов посвящен получению трансгенных регенерантов вольфии, в геном которых интегрированы гены, кодирующие гранулоцитарный колониестимулирующий фактор или гирудин. Всего в работе было использовано 16650 эксплантов, и было получено 75 независимых трансгенных популяций вольфии, которые затем были проанализированы на предмет наличия вставки. Также ряд полученных линий в дальнейшем был проанализирован на предмет продукции белка. В результате исследования были впервые получены трансгенные растения вольфии, экспрессирующие рекомбинантный гирудин человека с максимальным уровнем накопления около 0,7 мг/кг сырого веса и рекомбинантный ГКСФ с уровнем накопления около 35 мг/кг сырой массы. Однако уровень накопления гирудина оказался достаточно низким, что не дает возможности использования полученных линий для масштабного производства данного препарата. В то время как трансгенные линии вольфии, содержащие последовательность гена ГКСФ имели высокий уровень накопления данного белка, притом около четверти всего нарабатываемого в вольфии ГКСФ транспортировалось в среду культивирования.

В заключительном разделе данной главы обсуждаются возможные перспективы вольфии бескорневой в качестве потенциальной экспрессионной платформы.

СТЕПЕНЬ ОБОСНОВАННОСТИ И ДОСТОВЕРНОСТИ ВЫВОДОВ И РЕЗУЛЬТАТОВ, А ТАКЖЕ ЛИЧНЫЙ ВКЛАД СОИСКАТЕЛЯ.

Представленная диссертация представляет собой законченное научное исследование. Анализ большого объема экспериментальных данных и глубокий обзор отечественных и зарубежных публикаций по теме свидетельствуют о достаточной обоснованности положений, выносимых на защиту. Работа выполнена с использованием современных, апробированных методик и стандартных подходов к статистической обработке данных. Сформулированные автором выводы и рекомендации логически вытекают из полученных результатов, являются научно обоснованными и полно изложены. Текст диссертации отличается высоким качеством научного изложения.

Личный вклад соискателя.

Автор диссертации является ответственным исполнителем исследований, заявленных в тематике, непосредственно принимал участие в планировании исследования, проведении экспериментов, сборе и обработке полученных данных, формулировке научных положений и выводов, подготовке научных публикаций, написании и оформлении текста диссертации.

Таким образом, достоверность, обоснованность полученных результатов и личный вклад в исследования соискателя не вызывают сомнений.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ. Основные положения диссертации и материалы проведенных исследований были представлены на научных конференциях: XIV и XV Молодежные научные конференции, посвященные памяти академика РАСХН Г.С. Муромцева "Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии" (Москва, 2014 и 2015 г); международная научная конференции «Биология и биотехнология растений» (Алматы, 2014); 3-я международная конференция "Plant genetics, genomics, bioinformatics and biotechnology" (Новосибирск, 2015); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, ИРНИТУ 85 (Иркутск, 2015); International Conference on Duckweed Research and Applications 4th (Kerala, 2017); 18-я Всероссийская конференция молодых учёных «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», ФГБНУ ВНИИСБ (Москва, 2018); VII международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Севастополь, 2019).

ПОЛНОТА ПУБЛИКАЦИИ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ В НАУЧНОЙ ПЕЧАТИ.

По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из которых: 3 статьи в журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных ВАК РФ, 9 тезисов докладов международных и российских конференций.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДОВ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ.

Полученные автором результаты и сделанные на их основании выводы имеют широкий спектр применения. Растения вольфии обладают значительным биотехнологическим потенциалом в производстве рекомбинантных белков для медицины.

В свете задач практической биотехнологии, использование трансформированной *Wolffia arrhiza* в качестве платформы для производства рекомбинантного гранулоцитарного

колониестимулирующего фактора представляется высокоперспективным и технологически обоснованным решением. В то же время, экспрессия таких сложных пептидов, как гирудин, на данной платформе требует дополнительных исследований для достижения промышленно значимых выходов и функциональности.

Диссертационная работа в целом написана понятным языком, разделы изложены логично. Экспериментальная часть выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием современных методов молекулярной биологии и генетической инженерии. Интерпретация полученных результатов логична, аргументирована, научно обоснована. Работа представляет собой законченное исследование, большое по объему. Работа имеет широкое значение в области биотехнологии растений.

К работе есть мелкие замечания: в тексте работы встречаются опечатки, пунктуационные и грамматические ошибки, косноязычные выражения, а также использование жаргонизмов.

При этом принципиальных замечаний по диссертационной работе нет. При прочтении возникли вопросы уточняющего характера, которые не умаляют достоинств данной работы:

1. Каковы преимущества критерия Дункана по сравнению с другими методами статистического анализа? Почему был выбран именно этот критерий?

2. По мнению автора, могут ли условия глубинного культивирования растений вольфии бескорневой влиять на эффективность наработки терапевтических белков?

3. В разделе “Введение” автором использована фраза “Наиболее перспективными в настоящее время являются рекомбинантные вакцины”. Данное утверждение является спорным, так как существующие на данный момент и разрабатываемые вакцины (инактивированные, живые, субъединичные, мРНК, векторные вакцины и др.) по своей эффективности и другим характеристикам могут превосходить рекомбинантные вакцины.

4. Были ли оптимизированы нуклеотидные последовательности, кодирующие гирудин и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, по кодоновому составу для экспрессии в вольфии?

5. В заключении подводится итог работы, обсуждается корреляция между количеством локусов интеграции гена и уровнем продукции целевого белка. Важным при интеграции является и место инсерции гена, его окружение. Современные методы секвенирования позволяют определять последовательности, окружающие интегрированный ген. В рамках представленной работы такие эксперименты не проводились, однако хотя бы обсуждение данного вопроса стоило привести в заключительном разделе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ.

Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.6 – Биотехнология. Автореферат и научные публикации соответствуют содержанию диссертации. Выказанные замечания и пожелания не имеют принципиального значения и не снижают общей положительной оценки диссертационной работы. Диссертация Шведовой Анастасии Николаевны на тему: «Водное растение *Wolffia arrhiza* в качестве продуцента терапевтических рекомбинантных белков» представляет собой законченную научно-квалификационную исследовательскую работу, которая по своей актуальности, методическому решению поставленных задач, большому объёму выполненной работы, научной новизне и практической значимости соответствует требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении учёных степеней» (постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор А.Н. Шведова заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Отзыв на диссертационную работу Шведовой Анастасии Николаевны на тему: «Водное растение *Wolffia arrhiza* в качестве продуцента терапевтических рекомбинантных белков» рассмотрен и одобрен на заседании Института биоинженерии им. К.Г. Скрыбина Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», протокол № 1 от 15 октября 2025 г.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории Систем молекулярного клонирования
Института биоинженерии им. К.Г. Скрыбина
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»,
доктор биологических наук,
Специальность 1.5.3. – молекулярная биология

Евгения Сергеевна Марданова
Уважаемые коллеги!



Евгения Сергеевна Марданова
Марданова Евгения Сергеевна

А.М. Калмышская

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Контактный телефон +7 (495) 954-52-83, Email: info@fbras.ru.