

Відгук

офіційного опонента професора кафедри промислової біотехнології та біофармації факультет біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського доктора біологічних наук, Дугана Олексія Мартем'яновича на дисертаційну роботу Іванова Євгена Геннадійовича «Розробка способів одержання різних субстанцій із молозива та дослідження їхньої біологічної активності», представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – «Біотехнологія».

Актуальність дисертаційного дослідження: Докторська дисертаційна робота присвячена актуальній на сьогоднішній день тематиці, а саме, використанню розроблених автором препаратів з метою корекції біологічних процесів, таких, як якість і тривалість життя природними багатокомпонентними субстанціями. До таких природних багатокомпонентних субстанцій автор відносить препарати молозива. Отримані дисертантом препарати молозива володіють якісно новими можливостями в плані конструювання поліфункціональних надмолекулярних комплексів з новими властивостями. Такими комплексами є розроблені і отримані дисертантом, так звані, казеїн-поліфенольні сполуки, дія яких полягає у позитивних системних змінах в організмі на різних рівнях його організації – від клітин до цілісного організму.

Таким чином, актуальність роботи, що рецензується не викликає сумнівів. Ця актуальність підсилюється і тим, що перспективним є доставка лікарських засобів в клітини-мішені за допомогою препаратів казеїну, міцели якого здатні утворювати велику кількість водневих в'язків з іншими сполуками.

Технологія виділення поліфенольних сполук, стабілізація їх хлорогеновою кислотою, та технологія створення надмолекулярного комплексу «казеїн-молозиво-поліфенольні сполуки» є змістом докторської дисертації Іванова Євгенія Геннадієвича.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано на базі Науково-дослідного інституту біології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна згідно плану науково-дослідної роботи інституту за темами: «Виділення, характеристика та оцінка фізико-біохімічної активності низькомолекулярних компонентів молозива» за договором № 26-15; «Дослідження механізмів дії низькомолекулярних компонентів молозива на гемопоез і функцію інтоксикації печінки на моделі фіброзу печінки» за договором № 44-16; «Дослідження дозової залежності дії компонентів молозива на тест-об'єкти та характеристика редокс-системи організму» за договором № 05-18; «Визначення активності антиоксидантних ферментів: глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази на моделі фіброзу печінки» за

договором № 26-19 «Розробка системи контролю на різних етапах отримання біологічно активних компонентів з молозива» за договором № 02-21; «Дослідження впливу компонентів молозива на прояв постковідних ускладнень» за договором № 02-22; Дослідження впливу компонентів молозива на регуляцію термогенезу у старих тварин і написання монографії» за договором № 08-22; «Дослідження здатності ліпідних компонентів молозива до утворення гелевих структур і оформлення до друку монографії «Молозиво. Еволюційні, фізіологічні та біотехнологічні аспекти» за договором № 06-23.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Наукові положення про механізми дії компонентів молозива, висновки, яких дійшов автор, і практичні рекомендації добре обґрунтовані та експериментально доведені. Ефекти компонентів молозива залежать не тільки від дози, а й від функціонального стану організму, що показано на тваринах різного віку, на моделях токсикозу та фіброзу печінки.

Достовірність отриманих результатів дисертаційної роботи забезпечується коректною постановою задач із застосуванням комплексу сучасних методів досліджень, за якими проведено достатню кількість серій експериментів. Про достовірність отриманих даних свідчать і рівень їх публікацій у міжнародних наукових виданнях та апробація їх на міжнародних та Всеукраїнських наукових конференціях.

Наукове та практичне значення отриманих результатів.

Дисертант отримав нові наукові дані, які становлять і великий практичний інтерес. Експериментально показано, що низькомолекулярні компоненти, отримані з різних біологічних джерел (коров'яче молозиво, мікроорганізми *Sacharomyces cerevisiae* і *Pleurotus ostreatus*), проявляють схожі, поліфункціональні дії на організм. На експериментальних моделях було показано, що дія низькомолекулярних сполук різної біологічної природи індукують подібні біологічні відповіді на експериментальних моделях і, що дуже важливо, на моделях фіброзу печінки. Ці результати вказують на кілька фундаментальних положень. Насамперед на те, що вони здатні корегувати активність редокс-системи організму, а оскільки цю систему можна розглядати як базову систему регуляції метаболізму, то вона залежить не тільки від дози, але й від функціонального стану організму в момент впливу цих сполук. Теоретично важливим є й положення, згідно з яким поліфункціональність дії досліджуваних препаратів може пояснюватися індукцією гормезису, та їхньою системною дією на організм.

Запропоновано методику включення поліфенольних сполук, збагачених хлорогеновою кислотою, у міцели казеїну молозива. Ця розробка має значний потенціал для створення продуктів функціонального харчування. Крім того, низькомолекулярні компоненти молозива також викликають великий інтерес як основа для таких продуктів. Їхня

нетоксичність і здатність відновлювати функції печінки за умов фіброзу дозволяють розглядати ці речовини як перспективний гепатотропний фармакологічний препарат.

Представлено новий ефективний і простий у використанні "селективно-інтегративний" підхід до розділення молозива на окремі субстанції, який дозволяє знизити варіативність його складу та підвищити ефективність виділення компонентів із цільного молозива.

Повнота викладу результатів роботи в опублікованих працях.

Основний зміст дисертації викладено у 30 наукових працях, у тому числі 21 стаття в зарубіжних наукових журналах, з яких 10 наукових робіт проіндексовано в міжнародних наукометричних базах даних Scopus і Web of Science (1 стаття у виданні Q1, 1 стаття – Q2, 2 статті – Q3 та 4 статті – Q4), а також один розділ монографії (у закордонному виданні), та 8 тез доповідей на закордонних та вітчизняних наукових конференціях.

Дисертація Іванова Є.Г. є завершеною роботою, яка присвячена актуальній проблемі отриманню продуктів функціонального харчування з молозива та дослідженню їхньої біологічної активності на тваринних моделях.

Автореферат дисертації повністю відображає основні положення дисертації.

Оцінка змісту дисертаційної роботи.

Дисертаційна робота Іванова Є.Г складається із вступу, огляду літератури, розділи якої присвячено матеріалам і методам дослідження, а також вісім розділів, що описують результати проведених експериментів, та списку використаної літератури. Дослідження базується на значній кількості експериментів, виконаних дисертантом. Авторство Іванова Є.Г. полягає у розробці концепції дослідження, формулюванні робочих гіпотез, виконання експериментів, аналізі отриманих даних, їх інтерпретації та створенні висновків.

Перший розділ роботи – це огляд літератури, присвячений загальній і специфічній інформації про молозиво. За даними дисертанта, молозиво - це унікальний продукт еволюції ссавців, до складу якого входять БАР різноманітні типи клітин. Воно забезпечує новонароджених пасивним імунітетом і трофічними компонентами, а також виконує епігенетичне "програмування" онтогенетичних характеристик організму. Дисертант відмічає, що потенціал молозива на, сьогодні, практично не використовується через особливості його фізико-хімічних характеристик та малою вивченістю можливих біологічних дій його компонентів.

Дисертант робить висновок, що дослідження компонентів молозива потребують подальших зусиль в плані отримання продуктів функціонального харчування та нових медичних препаратів з широким спектром дії.

Другий розділ присвячений опису матеріалів і методів досліджень. Перелічені й описані всі сучасні методи, що були задіяні в роботі з відповідними посиланнями. Створений і охарактеризований дизайн експерименту з описом моделей та етапів дослідження.

Третій розділ – це суто експериментальні дослідження. Містить три великі підрозділи, **перший** з яких присвячений розробці «селективно-інтегративної» технології отримання біологічно-активних компонентів з молозива. В результаті проведених досліджень, дисертант обґрунтував «селективно-інтегративну» технологію зменшення біологічної варіабельності молозива і відмітив її переваги перед, так званим, «диференціальним» способом отримання білкових субстанцій з молозива. У **другому підрозділі** дисертант досліджував отримані низькомолекулярні компоненти молозива, що дозволило встановити зміну маси тіла дослідних тварин, зміну температури та втрату працездатності. Ці феномени дисертант пояснює перебудовою метаболізму та невеликими змінами функціональної активності печінки. І, оскільки зміни функціональних характеристик печінки відбуваються також під дією алкоголю, наркотиків і лікарських препаратів, то дисертант робить висновок, що Cu-індукований токсикоз може розглядатися як типова модель відповідної реакції організму на чужорідні сполуки. Далі, у рамках **підрозділу 3.3**, дисертант досліджував токсичні дії різних доз низькомолекулярних компонентів молозива, в результаті чого було встановлено факт тимчасової діареї під дією малих доз і загибель піддослідних тварин за великих доз.

Підрозділ 3.4 дисертант присвятив «Розробці експериментальних моделей фіброзу печінки для дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на функції печінки». Автором експериментально доведено, що багаторазове введення тваринам сірчаноокислої міді в дозі, що складає 33% від летальної, індукує зсув рівноваги в редокс-системі організму в бік прооксидантів що співставляється з дією відомого гепатотропного токсину тетрахлорметану. Таким чином був змодельований окисний стрес, який сформував системну адаптивну відповідь у вигляді фіброзу печінки, що може призвести або до відновлення змінених функціональних характеристик, або до хронічного фіброзу печінки з можливим переходом у цироз і летальний наслідок. Однак, автор відмічає, що адаптивна відповідь, на дію сірчаноокислої міді впливає вік тварин, що необхідно враховувати при лікуванні подібних захворювань печінки. До цього я б ще додав і функціональний стан організму на момент введення препарату. Цінним у цьому підрозділі є те, що дисертант запропонував механізм стадійного розвитку Cu-індукованого фіброзу печінки та обґрунтував можливість його використання при розробці системи корекції таких функціональних станів.

Назва **наступного підрозділу** «Дослідження впливу низькомолекулярних компонентів молозива на моделі Cu-індукованого

фіброзу печінки». Отримані дисертантом результати свідчать, що у розробленої моделі фіброзу печінки була підвищена активність фагоцитозу з причини підсилювання аутоімунних процесів внаслідок деградації компонентів клітин. Однак, якщо цим тваринам ввести низькомолекулярні компоненти молозива то фагоцитарний індекс у таких тварин збільшувався на 40 %. Цей феномен дисертант пояснює, з одного боку, як прояв імуногенності компонентів молозива на тлі розвитку фіброзу, з другого, як адаптивний характер, тобто відновлення функціональної активності печінки.

Підрозділ 3.6 має назву «Дослідження дії "Мікс-фактору" як представник горметинів на показники редокс-системи та тривалість життя тварин в експерименті». Підрозділ складається з двох частин. В обох випадках спочатку досліджується дія «Мікс-фактору» на редокс-системи тварин, потім вплив цього препарату на тривалість їх життя. Висновком із цього підрозділу є те, що під дією препарату «Мікс-фактор», який додавали в їжу протягом 12-33 місяців, у тварин, цитую, «...збільшувався вміст продуктів вільнорадикальних реакцій». Автором був встановлений «...виражений зв'язок між вмістом гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки та організмі загалом...». Цей встановлений науковий факт дозволив дисертанту припустити, що мітохондрії печінки є "маркером" «...вікових змін в організмі на рівні редокс-системи».

Передостанній підрозділ експериментальних досліджень дисертант присвятив «Розробці способу контролю якості фракцій молозива на основі визначення електропровідності компонентів молозива як інтегральний показник». У п'яти частинах цього підрозділу дисертант експериментально довів, що «...електропровідність молозива залежить від кількості ліпідів, якісного та кількісного складу білків, термінів і умов зберігання молозива, температури вимірювання і балансу заряджених і незаряджених молекул», а також від індивідуальних особливостей тварин (у даному випадку, корів).

Останній підрозділ також складається з двох частин. В першій частині дисертант обґрунтовує актуальність розробки способу отримання препарату під назвою «казеїн-поліфенольні сполуки, збагачені хлорогеновою кислотою». У другій частині – розробляє спосіб отримання цього препарату. В основу виконання підрозділу було покладено аналіз екзогенних та ендогенних причин, що лежать в основі біологічної варіабельності компонентів молозива. Далі було обґрунтовано "селективно-інтегративну" технологію зменшення біологічної варіабельності молозива і доведено переваги "інтегративної" технології отримання цільових продуктів порівняно з "диференціальним". Запропонована автором дисертації "селективно-інтегративна" технологія дозволяє отримувати сполуки, які можуть використовуватися в продуктах функціонального харчування фармацевтичних препаратах.

Висновки, у кількості 12 повністю відбивають зміст роботи.

Зміст та структура роботи у повній мірі відповідають завданням, а викладення основних результатів в процесі вирішення поставленої наукової проблеми – сформульованим окремим задачам дослідження, які відповідають паспорту спеціальності 03.00.20 – біотехнологія. Текст дисертації викладений в логічній послідовності, чітко, грамотно, усі структурні частини роботи є пов'язаними між собою. Рівень наукового дослідження є високим. Всі розділи містять логічні, обґрунтовані та аргументовані висновки.

Зауваження до дисертації.

Зауваження до ВСТУПУ

1. Мета роботи має містити тільки одне речення; у даному випадку їх чотири, які містять елементи задач дослідження.

Зауваження до Огляду літератури:

1. Відсутність загальної назви літогляду.

Зауваження до підрозділу 2

1. Не вказано статі щурів і їх вагу.
2. Якщо мова йде про рід водоростей, то так треба й писати, тоді як в тексті згадується видова назва

Зауваження до підрозділу 3.1.

1. Рис. 3.1 Незрозуміло, де починається назва рисунку, а де вона закінчується. Наведена схема – це оригінальна схема, чи автор невідомий?

2. Стор., 107. Дисертант стверджує, що чинники зовнішнього середовища можуть бути кваліфіковані за природою (тобто за походженням) на глобальні та локальні, але, до сих пір всі фактори навколишнього і внутрішнього середовища організму людини кваліфікувались на хімічні, фізичні і біологічні. Якщо це оригінальна класифікація дисертанта, то про це в тексті треба було навести.

3. У чому полягає суть «селективно-інтегративної» технології зменшення біологічної варіабельності молозива? У чому її переваги перед традиційними технологіями зменшення біологічної варіабельності молозива, як що така існує? Чи існує різниця між способом отримання чогось і технологією отримання?

4. Назва рисунка 3.3, на нашу думку, громіздка і не дуже вдала.

5. Підрозділ 3.1.3 – це суто методичний і його варто було б розташувати в розділі Матеріали і методи. Якщо це методика власної розробки, то назва має бути інакшою, щоб було видно, що це саме методика власної розробки.

6. Таблиця 3.2 наведені цифри не мають розмірності

Зауваження до підрозділу 3.2

1. Назви рисунків 3.10; 3.11; 3.12; 3.13; 3.14; 3.15, а також таблиці 3.5; 3.6 громіздкі і невдалі, містять зайву інформацію.
2. Немає таких понять «молода тварина», «стара тварина». Вік лабораторних щурів складає приблизно 36 місяців. Як правило, токсикологи і гігієністи в своїх досліджах використовують тварин, віком від 6-7 місяців. Цей вік вважається як дорослий; вага цих тварин, як правило складає 220-230 г.
3. Схема на рисунку 3.30 – це власна розробка? Як що ні, то потребує посилання. Як що так, то – згадування в тексті.
4. Що означає летальна доза з точки зору токсикології? У токсикології практикуються такі поняття: LD_{100} , LD_{50} , або 1/2; 1/5; 1/10 і т.д. LD_{100} , або LD_{50} .
5. У чому полягає сенс введення сірчаноокислої міді саме 33% від LD_{100} ?
5. Яка багаторазовість введення сірчаноокислої міді мається на увазі?

Зауваження до підрозділу 3.5

1. Таблиця 3.11 також потребує редагування, тому що вона містить багато зайвої інформації, у той же час, вона містить незрозумілу інформацію, наприклад, що означає молекули середньої молекулярної маси?

Зауваження до підрозділу 3.6

1. Які саме продукти вільнорадикальних реакцій мають на увазі?
2. Чому саме з 22-місячного віку щурам додавали препарат «Мікс-фактор»? 33 місяці – це вже скажімо так, дуже поважний вік для щурів, щоб на них ставити подібні експерименти, а головне, як потім екстраполювати отримані дані на людину, тому що весь сенс цієї роботи спрямований на отримання препаратів саме для людини.

У дисертації зустрічаються невдалі висловлювання та деякі помилки. При ознайомленні з дисертацією виникли питання дот здобувача, так би мовити, загального характеру

1. Відомо, що молозиво містить різноманітні фактори росту, зокрема й так званий «трансфер-фактор», який досить добре вивчений і показано його імуноотропну та антиканцерогенну дії. Чому Ви не виділяли та не вивчали його, а зупинилися на досить великій гетерогенній групі низькомолекулярних білків молозива?

2. Обґрунтуйте отримання поліфенольних сполук із соняшникового шроту, його особливості та перспективи використання у функціональному харчуванні.

3. Одним із положень, які Ви виносите на захист, є твердження, що компоненти молозива не впливають на метаболічні показники, які перебувають у межах гомеостазу, і, навпаки, ті показники, що виходять за

межі гомеостазу компоненти молозива, приводять їх у норму. Які механізми такої дії?

4. Чи є у вас думки відносно екстраполяції даних, отриманих на щурах, на людину у залежності від віку, статі і функціонального стану організму?

Висновки

Дисертаційна робота Іванова Євгена Геннадійовича «Розробка способів одержання різних субстанцій із молозива та дослідження їхньої біологічної активності» є завершеним науковим дослідженням. Наведені зауваження не впливають на високий науковий рівень та практичну цінність роботи. Одержано нові науково обґрунтовані результати, що в сукупності забезпечують розв'язання важливої проблеми отриманню продуктів функціонального харчування з молозива та дослідженню їхньої біологічної активності на тваринних моделях.

За змістом, рівнем виконання, новизною одержаних наукових результатів, їх практичною значущістю дисертаційна робота Іванова Є.Г. відповідає вимогам пунктів 7, 8, 9 "Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 р. No 1197, а її автор – Іванов Євген Геннадійович заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – «Біотехнологія».

Доктор біологічних наук,
професор



Олексій ДУГАН

