

Відгук

офіційного опонента, доктора біологічних наук, професора кафедри біологічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету Швеця Володимира Миколайовича 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».

1. Актуальність теми дослідження.

Відомо, що нині має місце неухильне зростання патологій печінки. Статистичні дані свідчать про те, що смертність, спричинена цирозом, гепатоцелюлярним раком, гепатитами та ін. захворюваннями печінки, посідає 5 місце у світі. Це може пояснюватися як мінімум двома причинами. Зростанням індукторів гепатопатологій і біологічною особливістю та насамперед детоксикаційною функцією цього органу. Як відомо, печінка є тим життєво важливим органом, який не тільки забезпечує організм унікальними білками та ліпідами і бере участь у регуляції широкого спектра метаболічних процесів, виконує функцію детоксикації організму від негативних дій різноманітних токсичних сполук. Для виконання цих різноманітних і надзвичайно важливих функцій для забезпечення життєдіяльності організму, в процесі еволюції виробилися кілька різноманітних стратегій збереження функціональних характеристик цього органу. Насамперед, це висока здатність до регенерації. Якщо ця стратегія відновлення на тлі дії токсичних сполук не забезпечує виконання гомеостатичних функцій, може мати місце гіпертрофія гепатоцитів, збільшення плоідності та об'єму клітин печінки. Поряд з цим, у деяких випадках, має місце порушення структури гепатоцитів. У відповідь на такі події у організмі формується запальний процес, який в свою чергу веде до індукції фіброгенезу. Розростання сполучної тканини в печінці (фіброз), неминуче призводить до втрати функціональних характеристик печінки та розвиток патології. Необхідно відзначити, що для захворювань печінки характерно проходження декількох стадій формування патології.

На жаль, незважаючи на глибокі та багаторічні дослідження механізмів розвитку патологій печінки та розробку лікарських засобів, лікування цих патологій залишаються малоефективними. Це може

пояснюватися тим, що на певних стадіях розвитку патологічного процесу патології печінки переходять у хронічні або незворотні стани. Механізми формування хронічних станів і пошук способів «оборотності» подібних метаболічних станів є однією з фундаментальних і актуальних біомедичних проблем. Вже тільки цей аспект дисертаційної роботи Іванова Є.Г. робить її актуальною і своєчасною.

Методологія рішення проблеми лікування патологій печінки в цій роботі ґрунтується на використанні природних біологічних субстанцій, що містяться в молозиві. Такий біотехнологічний підхід є досить перспективним.

Використання природних продуктів, які можуть бути віднесені до продуктів функціонального харчування, можуть бути ефективними в попередженнях цих небезпечних патологій.

Це дає змогу стверджувати, що дисертаційна робота Іванова Є.Г., яка присвячена розробленню способів одержання різних субстанцій із молозива та дослідженню їхньої біологічної активності, і на самперед на моделі фіброзу, є оригінальною і перспективною у вирішенні цієї біомедичної проблеми.

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

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.

3. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому і оформлення

Дисертація містить такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, висновки та список використаних джерел. Дослідження охоплюють значну кількість експериментів, які охоплюють отримання різних фракцій молозива, їх характеристика та вивчення їх біологічних властивостей. Ідея цього дослідження, робочі гіпотези та планування експериментів та виконання експериментальної роботи, а також аналіз отриманих результатів, їх обґрунтування та формування висновків належать Іванову Є.Г. Дисертація містить 14 таблиць і 63 рисунків з основними результатами власних експериментів. Робота викладена на 325 сторінках друкованого тексту. Відзначається значний список використаних літературних джерел, що налічує 436 наукових робіт, більшість з яких – сучасні англomовні наукові статті у закордонних наукових журналах та монографіях. Зміст та структура роботи повністю відповідають завданням, а виклад основних результатів у процесі вирішення наукової проблеми - окремим завданням дослідження, що відповідають паспорту спеціальності 03.00.20 – біотехнологія. Текст дисертації представлений логічно, чітко і грамотно, усі структурні частини роботи пов'язані між собою. Рівень наукового дослідження є високим. Всі розділи містять логічні, обґрунтовані та аргументовані висновки.

4. Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях.

Матеріали дисертації відтворені в публікаціях автора і знайшли належне висвітлення на вітчизняних та міжнародних форумах. За результатами досліджень опубліковано 30 наукових праць, у тому числі:

- 1 розділ у колективній монографії;
- 21 стаття у наукових періодичних виданнях інших держав з напяму, з якого підготовлено дисертацію (в.т.ч. 10, що включені до міжнародних наукометричних баз SCOPUS та Web of Science Core Collection, з яких 4 статті у виданнях, віднесених до першого — третього кватилів (Q1—Q3)

відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank та Journal Citation Reports;);

- 8 тез та доповідей на наукових конференціях.

5. Найважливіші наукові результати, що містяться в дисертації.

Основні результати дисертації добре обґрунтовані і проаналізовані автором, підкріплені експериментальним дослідженням із використанням різноманітних методик дослідження на різних рівнях організації живої матерії, від молекулярних, клітинних до фізіологічних. Достовірність отриманих результатів не викликає сумнівів. Результати дослідження та основні положення дисертаційної роботи були представлені, апробовані та отримали позитивну оцінку на міжнародних та Всеукраїнських наукових конференціях. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 31 наукова праця, у тому числі один розділ монографії у міжнародному віданні, 21 стаття в зарубіжних наукових журналах, з яких 10 наукових робіт проіндексовано в міжнародних наукометричних базах даних Scopus і Web of Science.

6. Наукова новизна одержаних результатів полягає у наступному:

Розроблено "селективно-інтегративний" метод отримання основних субстанцій з молозива (ліпідної фракції, казеїну, низькомолекулярних компонентів молозива та ультрафільтрату), що дозволяє підвищити вихід цільових продуктів та сприяти їх частковій стандартизації. Отримані субстанції молозива, насамперед казеїн, низькомолекулярні компоненти молозива и «ультрафільтрат» являють собою сухі порошки, які є стабільними, довго зберігаються та зручні у використанні.

Встановлено поліфункціональність дії низькомолекулярних компонентів молозива (НКМ), яка проявляється у антитоксичній, антифібротичній, прооксидантній, антиоксидантній діях та ін., і залежить не лише від дози, але й від функціонального стану метаболізму організму на момент впливу НКМ. Це дуже важливе та фундаментальне положення яке, з одного боку дозволяє пояснити наявність варіабельності відповіді на дію одного й того ж самого препарату, а з іншого, вказує на необхідність враховувати функціональний стан організму у процесі навчання, що може значно збільшити його ефективність.

Експериментально доведено, що поліфункціональність дії НКМ обумовлена як специфічною дією на редокс-систему організму, так і неспецифічною - горметичною дією, що проявляється у системній дії на елементи біологічної системи.

Виявлено відсутність токсичної дії НКМ у широкому діапазоні доз (від 0,01 до 0,5 г/100 г маси), при цьому за надвеликих доз можуть виникати індивідуальна непереносимість, що для дорослої людини може становити до 3,5 кг на добу.

Доведено можливість використання НКМ як продукту функціональної їжі, який проявляє антитоксичну дію, підвищує працездатність експериментальних тварин і покращує "якість життя". Автором дисертації проведено великий об'єм експериментальної роботи по розробці нової моделі Cu-індукованого фіброзу печінки. Вперше на експериментальній моделі фіброзу печінки показано гепатотропну дію НКМ і обґрунтовано механізм його дії на організм.

Запропоновано використовувати метод визначення електропровідності компонентів молозива для стандартизації рідких полікомпонентних біологічних субстанцій. Цей метод має ряд переваг перед існуючими методами контролю.

Виявлено, що низькомолекулярні компоненти молозива і з інших біологічних джерел мають схожі біологічні дії, що вказує на їх можливу приналежність до групи горметинів, які можуть індукувати ефект гормезису в організмі, пояснюючи поліфункціональність та неспецифічність дії.

Вперше показано можливість "включення" поліфенольних сполук до складу казеїнових міцел, що супроводжується змінами у протеїновій частині міцел. Запропоновано використовувати казеїн молозива як засіб доставки та стабілізації поліфенольних сполук в організм.

7. Практична значущість результатів дисертаційного дослідження.

Розроблено експериментальну модель Cu-індукованого фіброзу печінки та проведено порівняльні дослідження цієї моделі з відомою тетрахлорметановою моделлю цієї патології, що розширює можливості подальших досліджень патологій печінки, та пошук засобів лікування.

Запропоновано новий, простий та ефективний "селективно-інтегративний" спосіб розділення молозива на компоненти, що дозволяє частково знизити варіабельність складу компонентів молозива та

підвищити ефективність його розділення на компоненти. Це дає можливість використовувати молозива у якості продуктів функціонального харчування.

Розроблено метод включення поліфенольних сполук, збагачених хлорогеновою кислотою, у казеїнові міцели молозива, що має значний потенціал у створенні продуктів функціонального харчування. Низькомолекулярні компоненти молозива також є перспективними як продукти функціонального харчування. Відсутність токсичності низькомолекулярних компонентів молозива та відновлення деяких функцій печінки при фіброзі дозволяють розглядати цю субстанцію як перспективний фармакологічний препарат з гепатотропною дією.

Розроблена технологія отримання біологічно активних субстанцій із молозива використовується в НДІ біології для отримання біологічно активних субстанцій, та на кафедрі молекулярної біології та біотехнології біологічного факультету Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна під час виконання практичних занять, магістерських кваліфікаційних робіт та дисертаційних робіт.

Отримані результати використовуються при викладанні курсу "Фармацевтична біотехнологія", спецкурсів "Об'єкти біотехнології" та "Імунобіотехнології" на кафедрі молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна.

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

Докторська дисертація Іванова Євгена Геннадійовича становить значний науковий внесок у галузь біотехнології. Результати досліджень розширюють наше розуміння механізмів впливу багатокomпонентних субстанцій на біологічні системи за різних функціональних станів, таких як вікові зміни, токсикози та фібрози. Особливу увагу заслуговує поліфункціональна дія низькомолекулярних компонентів молозива, яка пояснюється їхньою неспецифічною гормезисною активністю. Запропоновані методи зменшення варіативності складу молозива, а також інтегративні підходи до якісної та кількісної оцінки його компонентів є інноваційними та мають велике наукове значення.

На основі тексту дисертації та наукових публікацій Іванова Є.Г. можна зробити висновок, що результати є обґрунтованими, достовірними та відповідають заявленій меті і завданням дисертаційної роботи. Обґрунтованість і достовірність представлених результатів забезпечується:

- застосуванням двох експериментальних моделей дослідження, за якими проведено достатню кількість серій експериментів;
- використанням адекватних статистичних методів аналізу результатів дослідження;
- аналізом та порівнянням отриманих результатів з використанням сучасних літературних даних за тематикою дослідження;
- чисельною апробацією отриманих результатів дисертаційного дослідження на наукових та науково-практичних конференціях, а також публікацією результатів дисертаційного дослідження в фахових наукових виданнях.

9. Дотримання академічної доброчесності та оформлення дисертації.

За результатами аналізу дисертаційної роботи та публікацій автора порушення академічної доброчесності не виявлено. Елементи фальсифікації чи фабрикації тексту в роботі відсутні. Дисертація Іванова Є.Г. «Розробка способів одержання різних субстанцій із молозива та дослідження їхньої біологічної активності» відповідає всім вимогам пп. 7, 8, 9 "Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук" затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 р. No 1197.

10. Дискусійні положення та зауваження до змісту дисертації.

Загальне враження від представленого дослідження є виключно позитивним. Робота є добре спланованою та виконано на сучасному рівні. Як і в будь-якій ґрунтовній роботі в даній дисертації присутні поодинокі типографічні помилки та невдалі фрази. Серйозних недоліків, що ставили під питання відповідність дисертаційної роботи актуальним вимогам не виявлено. Серед зауважень, що виникли при ознайомленні з роботою варто зупинитись на наступних:

1. На рис. 3.4 (стор. 115) автором показано, що в результаті мембранної фільтрації надосадкової рідини утворюється фільтрат, хоч по тексту дисертації одержаний розчин фігурує під назвою «ультрафільтрат».
2. На рис. 3.5 (А) (стор. 120) вісь ординат позначена як «Вміст, %» хоч відповідно до загальноприйнятих правил представлення результатів мас-спектрального дослідження дана вісь відображає інтенсивність відносно найбільш інтенсивного сигналу у спектрі.

3. Автору варто було більш детально аргументувати необхідність проведення в рамках дисертаційної роботи дослідження антибактеріальної активності міді сульфату.
4. До розділу «Матеріали та методи дослідження» варто було включити підрозділ, що описує виділення та особливості УФ-спектрофотометричного дослідження поліфенольних сполук.
5. На стор. 270 автор зазначає, що кількість поліфенольних сполук визначалась за площею піків поглинання. В методі УФ-спектрометрії для розрахунку концентрації аналітів як правило використовується значення оптичної густини в максимумі поглинання.

Стосовно змісту дисертаційної роботи не виявлено. Зауваження, які виникли при аналізі дисертації не торкаються суті роботи і мають переважно рекомендаційний характер: бажано отримати відповідь від автора на деякі додаткові питання:

1. Ви пропонуєте використовувати вимірювання електропровідності під час оцінювання продуктів, одержуваних із молозива, поясніть переваги та особливості цього методу? Чому для визначення електропровідності було використано оригінальний підхід та устаткування, а не стандартне (кондуктометр) обладнання.

2. Дайте характеристику «Мікс-фактору» його склад, властивості та ким отримано?

3. Чому при дослідженні антиоксидантних ферментів ви обрали пару ГПО та глутатіонредуктазу та білок глутатіонредоксин? Чому не були обрані ферменти, які каталізують інші не менш важливі антиоксидантні реакції (СОД, феррооксидаза, глутатіон та ін.)?

4. На якій підставі Ви обрали саме фермент аконітазу як показник окисного стресу, а не інші відомі маркери цього процесу?

5. Ви зазначаєте, що рівень МДА у тварин має вік-залежний характер і після введення тетрахлорметану вміст МДА в мітохондріях печінки був однаковим як у молодих, так і у старих щурів, чи є літературні дані з цього приводу та з чим Ви це пов'язуєте?

Загалом ці зауваження ніяк не знижують загальної позитивної оцінки проведених дисертантом досліджень та отриманих результатів.

11. Загальні висновки щодо дисертаційної роботи

Дисертаційна робота Іванова Євгена Геннадійовича «Розробка способів одержання різних субстанцій із молозива та дослідження їхньої біологічної активності» є актуальним завершеним науковим дослідженням, має наукову новизну і практичну значущість. Тема і зміст дисертації відповідають спеціальності 03.00.20 – «Біотехнологія», та вимогам вимогам пп. 7, 8, 9 "Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук" затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 р. No 1197".

Враховуючи актуальність, обґрунтованість наукових положень і висновків, наукову новизну та практичну значущість дисертаційної роботи, а також дотримання академічної доброчесності, що підтверджено відповідними документами, вважаю, що Іванов Євген Геннадійович заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – «Біотехнологія».

Офіційний опонент,
доктор біологічних наук,
професор кафедри біологічної хімії
Запорізького державного
медико-фармацевтичного
університету



Сноручний підпис
ПІДТВЕРДЖУЮ
Підписав: [підпис]
Підписав: [підпис]
04 20 25 р. Підпис [підпис]

Володимир ШВЕЦЬ

[підпис]