

ВІДГУК

офіційного опонента Циганкової Вікторії Анатоліївни
на дисертаційну роботу Ракші Наталії Григорівни «Розробка біотехнологічних
підходів створення білкових інноваційних продуктів з гідробіонтів Антарктичного
регіону», представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Актуальність дисертаційного дослідження. Актуальним напрямком сучасної біотехнологічної галузі є створення технологій отримання інноваційних продуктів на основі молекул природного походження, зокрема, ферментів, структурних білків, білкових гідролізатів, пептидів, які використовуються як біологічно активні компоненти для виробництва фармацевтичних препаратів, вакцин, косметичних препаратів, харчових добавок та функціональних дієтичних продуктів для людей, кормових добавок та біостимуляторів в агропромисловому секторі, а також входять до складу побутових засобів. Аналіз сучасних тенденцій на ринку біотехнологічних продуктів свідчить про зростання частки продукції на основі молекул природного походження, у тому числі й засобів на основі білків та пептидів, які з огляду на широкий спектр біологічних активностей, розглядаються як перспективні засоби не лише для профілактики розвитку захворювань, асоційованих з порушенням прооксидантно-антиоксидантної рівноваги чи попередження розвитку ускладнень, супутніх патогенезу основного захворювання, а й для лікування таких хвороб як ожиріння, цукровий діабет 2-го типу, метаболічний синдром.

Особливої значимості проблема пошуку нових джерел біологічно активних речовин з метою їх застосування для профілактики чи корекції патологічних станів набуває у світлі невпинного і стрімкого зростання частки населення, що страждає на такі соціально важкі хвороби як ожиріння, діабет 2-го типу, серцево-судинні патології, захворювання, що супроводжуються високим ризиком тромботичної загрози, та зростанням частки цих патологій серед населення віком до 60 років. Встановлено, що підвищений рівень білка фібриногену - головного маркера активації системи зсідання крові та загрози тромбоутворення з фібриногену під дією тромбіну, є фактором ризику розвитку ішемічного інсульту, артеріальної гіпертензії, інфаркту міокарду, асоційованих з потовщенням стінок судин та субклінічними проявами їх атеросклеротичного ураження. На сьогодні доведеним є факт, що до ключових патогенетичних механізмів розвитку ускладнень за COVID-19 належать порушення у системі гемостазу, проявом чого є гіперфібриногенемія.

Враховуючи серйозні економічні та соціальні наслідки вище згаданих захворювань, доцільною та обґрунтованою може бути стратегія, спрямована на попередження або зниження ризиків розвитку ускладнень, характерних для

патогенезу захворювання. Як приклад, одним з можливих напрямків в рамках комплексного підходу боротьби з ожирінням може бути розробка відносно недорогих та ефективних препаратів профілактичної дії. Фармакологічні засоби, що застосовуються на сучасному етапі лікування ожиріння мають низку побічних ефектів при їх тривалому застосуванні та при монотерапійному підході лікування знижують масу тіла не більше ніж на 8-10 % у рік. Відсутність в арсеналі сучасних лікарських засобів достатньо ефективних та безпечних препаратів актуалізує проблему розробки препаратів, що характеризуються ефективною профілактичною та/чи терапевтичною дією і є безпечними у випадку їх тривалого вживання.

Вкрай актуальним питанням є вирішення проблеми виробництва в Україні лікарських засобів, які сприяють загоєнню ран, з метою максимального заміщення імпортованих вітчизняними засобами та розширення їх асортименту, що обумовлено порушенням внаслідок воєнних дій на території України напрацьованих логістичних маршрутів та шляхів постачання субстанцій для фармацевтичного сектору промисловості, а також готових лікарських засобів.

Варто зазначити, що виділення та очищення білкових молекул з традиційних джерел сировини пов'язане з низкою труднощів, серед яких недостатня кількість сировини, потенційна загроза контамінації продукції інфекційними агентами, характерними для сировини тваринного походження, а відтак необхідність включення в технологічні процеси додаткових стадій очищення і контролю чистоти продукції, що впливає на собівартість кінцевого продукту. Незважаючи на значні досягнення в області рекомбінантних технологій їх активне застосування для створення молекул із заданими властивостями часто є економічно невиправданим з огляду на значну вартість кінцевого продукту, тому більш виправданим є пошук та використання альтернативних природних молекул, властивості яких відповідають запитам дослідників.

Один з біотехнологічних напрямів передбачає активне використання ферментів для отримання біоактивних низькомолекулярних білків та пептидів, впровадження яких дозволяє оптимізувати існуючі виробничі алгоритми з урахуванням особливостей сировини та споживчих запитів, сприяє покращенню параметрів технологічних процесів та зниженню навантаження на довкілля через заміну хімічного гідролізу на більш екологічний ферментативний, дозволяє розвивати нові наукоємні напрямки. З цих причин на сучасному етапі розвитку науково-технологічного прогресу перевага віддається екологічно безпечним технологіям отримання біологічно активних низькомолекулярних білків та пептидів з використанням природних ферментів.

Отже, зростаюча потреба у білкових молекулах з цільовими активностями спонукає до пошуку доступних та економічно виправданих джерел сировини для їх одержання, розробки підходів щодо максимально ефективного використання

сировини та залучення у технологічні цикли відходів, що накопичуються на різних етапах переробки сировини з метою одержання фракцій біологічно-активних молекул з властивостями, що дозволяють їх використання як профілактичних засобів чи засобів, спрямованих на корекцію метаболічних порушень за розвитку окремих патологій є актуальним та економічно перспективним напрямком.

У цьому контексті, гідробіонти Світового океану можуть бути перспективним джерелом сировини. Вельми перспективним напрямком може бути використання як сировини непромислових видів гідробіонтів, а також відходів рибної промисловості та переробки гідробіонтів, що є економічно і екологічно обґрунтованим, так як дозволяє одночасно вирішувати дві важливі задачі – забезпечує комплексне використання біоресурсів та частково сприяє вирішенню проблеми утилізації відходів, які є суттєвими факторами забруднення навколишнього середовища. Не зважаючи на те, що біотехнологічний потенціал гідробіонтів досліджується досить інтенсивно, на сьогодні проведено досить обмежену кількість робіт, які присвячені одержанню та вивченню властивостей біологічно активних речовин з гідробіонтів Антарктичного регіону.

З огляду на існуючі запити та потреби сучасної біотехнологічної галузі, автором цієї дисертаційної роботи було розроблено біотехнологічні засади для розробки технологій отримання інноваційних продуктів на основі білкових молекул: протеолітичних ферментів, колагену, його низькомолекулярних фрагментів та пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону на прикладі малоцінних видів гідробіонтів та потенційно інвазивних видів як альтернативного джерела молекул білкової природи, а також проведено фундаментальні дослідження потенційних ефектів отриманих біотехнологічних продуктів на модельних системах *in vitro* та *in vivo*.

Зв'язок роботи із науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у рамках науково-дослідних тем Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, зокрема, «Механізми реалізації адаптаційно компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011-2015 рр.); «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.) та науково-дослідних робіт за державною цільовою науково-технічною програмою проведення досліджень в Антарктиці на 2011-2023 роки: «Отримання та характеристика цільових біотехнологічних продуктів з тканин антарктичної медузи» (№ д/р 0121U112501, 2021 р.); «Отримання та характеристика пептидних молекул, що виявляють цільові активності, з гідробіонтів Антарктичного регіону» (№ д/р 0120U104207, 2020 р.); «Отримання та молекулярно-біохімічна характеристика фібрино(гено)літичних ферментів з морських гідробіонтів

Антарктичного регіону» (№ д/р 0119U002995, 2019 р.); «Пептиди, отримані з антарктичного морського гребінця *Adamussium colbecki*, як потенційний засіб корекції метаболічних порушень організму, спричиненої розвитком ожиріння» (№ д/р 0117U004992, 2017 р.); «Пептиди колагену, отримані з луски антарктичних риб, як основа для створення засобів профілактично лікувальної дії на розвиток ожиріння та вивчення механізмів їх дії» (№ д/р 0116U007769, 2016 р.); «Скринінг потенційних об'єктів отримання препаратів білків та пептидів для фармакологічного застосування» (№ Н/1-2014, 2014 р.); «Розробка методологічних підходів та створення колекції препаратів білків та пептидів з антарктичних організмів» (№ д/р 0113U005690, 2013 р.); «Розробка технологій отримання препаратів білків та пептидів з антарктичних організмів» (№ д/р 0112U008038, 2012 р.).

Структура та обсяг дисертації. Робота складається зі вступу, огляду літератури (три розділи), опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень (три розділи), узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел і додатків. Список використаних джерел нараховує 441 найменування. Дисертація викладена на 351 сторінці, з них основна частина займає 267 сторінок, робота містить 29 таблиць та 70 рисунків.

Перший розділ є оглядовим і має назву «Біологічно-активні сполуки з гідробіонтів як основа для створення сучасних біотехнологічних продуктів». Він складається з трьох підрозділів, в яких наведено детальну інформацію щодо сучасного ринку біотехнологічних продуктів на основі білкових молекул з гідробіонтів з акцентом на засоби на основі пептидів, колагену та його гідролізатів; узагальнено основні методологічні підходи щодо створення біотехнологічних продуктів на основі молекул з гідробіонтів; окреслено перспективи подальшої розробки та впровадження цільових біотехнологічних продуктів на основі молекул з гідробіонтів. В кінці розділу на основі викладеного аналізу даних світової літератури, автором зроблено висновок щодо перспективи розробки оптимальних методологічних підходів для отримання, тестування білків та пептидів з антарктичних організмів з метою подальшого впровадження цих білкових молекул у біотехнологічне виробництво.

Другий розділ дисертації присвячено опису методології дослідження. На початку розділу наведено інформацію про застосовувані у роботі реагенти, матеріали та обладнання, зазначено які саме гідробіонти з Антарктичного регіону було використано як вихідний матеріал для одержання молекул білкової природи.

Розділ містить перелік методик, які автор застосував задля вирішення мети дисертаційного дослідження та досягнення окремих завдань роботи. Детально описано спосіб отримання екстрактів тканин гідробіонтів Антарктичного регіону, описано методи отримання білкових молекул та пептидів, зокрема, хроматографічні підходи очищення фракції серинових протеїназ з медузи

Diplulmaris antarctica, трипсиноподібного ферменту з гідробіонту Антарктичного регіону – морського гребінця *Adamussium colbecki* та фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону – морського їжака *Sterechinus neumayeri*, морської зірки *Odontaster validus*, криля *Euphausia superba*, немертини *Parborlasia corrugatus*; наведено метод екстракції колагену з луски риб *Champscephalus gunnari*, *Nototheniidae* та медузи *Diplulmaris antarctica*; наведено описи різних методичних підходів щодо отримання пептидів, у тому числі пептидів колагену, ендогенних пептидів, гідролізних пептидів та пептидів, отриманих шляхом ферментативного гідролізу колагену.

Розділ містить опис методів, які автор використав для визначення загальної протеолітичної активності виділених з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону ферментів та визначення активності ферментів з використанням хромогенних субстратів, антиоксидантного потенціалу пептидів та їх мембранопротекторної активності, оцінки впливу очищених фібрино(гено)літичних ферментів на окремі фактори судинно-тромбоцитарної ланки системи гемостазу, дослідження антикоагуляційних властивостей у фібрино(гено)літичних ферментів на модельних системах *in vitro*, а також опис методів, спрямованих на виявлення ефектів пептидів на моделях тварин *in vivo*. Детально описано дизайн експериментів зі створення у щурів моделі ожиріння, індукованого споживанням висококалорійної дієти, моделі вирізаних площинних ран, визначення показників, що асоційовані з розвитком інсулінорезистентності, оцінку оксидативного балансу та оцінку стану периферійної серотонінергічної системи, а також згадані всі необхідні нормативно-правові акти, що регламентують поведження та експериментальні дослідження з лабораторними тваринами.

Наступні розділи третій, четвертий та п'ятий, які описують результати проведеної автором експериментальної частини роботи, відповідають меті дослідження і завданням дисертаційної роботи та поділяються на окремі частини, що логічно згруповані за послідовністю викладення матеріалу.

Третій розділ дисертації присвячено оцінці перспективності використання гідробіонтів Антарктичного регіону: морського гребінця *Adamussium colbecki*, морського їжака *Sterechinus neumayeri*, морської зірки *Odontaster validus*, криля *Euphausia superba*, немертини *Parborlasia corrugatus* та медузи *Diplulmaris antarctica* як джерела молекул білкової природи для біотехнологічних цілей та виявленню видів, найбільш придатних для одержання окремих білкових молекул та пептидів.

Автором проведено дослідження білкового профілю тканин гідробіонтів Антарктичного регіону та виявлено присутності білків у діапазоні молекулярних мас від 13 до 180 кДа, що підвищує ймовірність виділити з-поміж загального спектру білкових молекул ті, що можуть виявляти потенційно привабливі структурні чи функціональні характеристики. За результатами ензим-

електрофоретичного аналізу з використанням різних субстратних білків встановлено, що всі досліджувані гідробіонти містили високо активні протеолітичні ферменти різної молекулярної маси, що здатні розщеплювати желатин, фібриноген та колаген, окремі гідробіонти виявляли вищу специфічність до того чи іншого субстратного білка. Найвищу активність щодо фібриногену було виявлено у тканинах морського гребінця та морського їжака, щодо колагену – у тканинах морського їжака, зірки та немертини. Згідно отриманих результатів, домінуюча частина протеолітичної активності у тканинах медузи, морського гребінця та зірки представлена сериновими протеїназами, у той час тканини немертини містять переважно металозалежні ферменти.

На основі результатів дослідження білкового профілю окремих видів гідробіонтів Антарктичного регіону та оцінки присутності в тканинах гідробіонтів ферментів з різною субстратною специфічністю та різною будовою активного центру (за даними аналізу з використанням інгібіторів протеїназ), автором обґрунтовано можливість використання обраних видів гідробіонтів для одержання цільових білкових молекул, зокрема, серинових протеїназ, які є одними з найбільш поширених ферментів у промисловості і медицині, а також ферментів, здатних розщеплювати фібриноген. Крім того, достатній вміст білка дозволяє використовувати гідробіонти Антарктичного регіону для отримання фракції пептидів.

Четвертий розділ дисертації присвячено розробці технологій очищення біотехнологічно перспективних ферментів, зокрема, серинових протеїназ і фібрино(гено)літичних ферментів, а також дослідженню їх основних фізико-хімічних характеристик і біологічної активності.

Автором порівняно ефективність декількох хроматографічних підходів для одержання фракції серинових протеїназ з антарктичної медузи та запропоновано застосування: 1) афінної хроматографії на бензамідин-сефарозі та елюція матеріалу, який зв'язався з хроматографічним носієм, буфером, що поєднує низьке значення рН і високий вміст солі для одноетапного одержання фракції серинових протеїназ; 2) хроматографії на КМ-сефарозі чи ДЕАЕ-сефарозі при рН 10,0 та елюція матеріалу, який зв'язався з хроматографічним носієм, буфером з 25 % NaCl для одержання фракції протеолітичних ферментів з різною будовою активного центру. Присутність у фракції серинових протеїназ, ферментів, здатних розщеплювати фібриноген та колаген, свідчить про певний біотехнологічний потенціал антарктичної медузи як джерела для одержання ферментів. Так, ферменти з колагенолітичною активністю можуть знайти застосування у шкіряній, текстильній галузях промисловості для пом'якшення вихідного матеріалу, позбавлення від супутніх білкових домішок або на стадії утилізації відходів виробництва. Варто відмітити, що ферменти, які здатні ефективно розщеплювати фібриноген не викликаючи при цьому утворення згустку, можуть

бути потенційними антитромботичними агентами, тому отримані нами результати є цікавими та перспективними з позицій можливого використання ферментів з антарктичної медузи як фібрино(гено)літичних засобів.

Визначений температурний оптимум серинових протеїназ з антарктичної медузи при +55 °С та збереження активності в широкому діапазоні значень рН з максимальним проявом активності при рН 12,0 відкриває перспективи їх можливого використання у виробництвах, що потребують вищих температур та характеризуються нестійкістю або зміною значень рН впродовж технологічного процесу.

Підхід, що поєднує два хроматографічні етапи – афінну хроматографію на СІТ-сефарозі та хроматографію, що поділяє за розмірами (носій супердекс 75), виявився ефективним для очищення трипсиноподібного ферменту з гідробіонту антарктичного морського гребінця. Із застосування запропонованого підходу було одержано трипсиноподібний фермент з антарктичного морського гребінця, який за молекулярною масою, здатністю розщеплювати зв'язки в утворенні яких задіяні залишки аргініну чи лізину, а також значенням рН оптимуму при рН 8,0 був подібний до канонічних трипсинів. Виявлена властивість трипсиноподібного ферменту зберігати активність на рівні майже 100 % при +8 °С, температурний оптимум при +24 °С та нестійкість молекули ферменту може бути досить перспективними характеристиками ферменту з позиції його можливого впровадження у біотехнологічні виробництва, що потребують нижчих температур перебігу процесу та можливостей швидкої інактивації каталізатору.

У результаті поєднання методів афінної хроматографії на голубій-сефарозі та хроматографії, що поділяє за розмірами (носій супердекс 200), з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону було одержано фібрино(гено)літичні ферменти, які за результатами інгібіторного аналізу належать до металопротеїназ (ферменти з морського їжака, морського гребінця) та серинових протеїназ (фермент з морської зірки). Очищені фібрино(гено)літичні ферменти виявляли виражені антикоагуляційні властивості, зокрема, пригнічували АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів та специфічно розщеплювали молекулу фібриногену з утворенням фібриногену зі зниженою здатністю до полімеризації у фібриновий згусток при додаванні тромбіну.

На основі результатів дослідження автором зроблено висновок про можливість використання у медичній практиці серинових протеїназ з медузи та фібрино(гено)літичних ферментів з морського їжака, зірки та морського гребінця як складових для створення засобів діагностики та профілактики патологічних змін у системі гемостазу, компоненту багатофункціональних композитів ранозагоювальної дії для лікування інфікованих та гнійно-некротичних уражень шкіри та м'яких тканин, створення профілактично-лікувальних гідролізатів, а також для усунення в організмі дефіциту власних ферментів.

П'ятий розділ дисертації присвячено отриманню пептидів та дослідженню їх деяких біологічних активностей та ефектів на моделях *in vitro* та *in vivo*. Автором оптимізовано метод одержання пептидів колагену з луски риб *Champscephalus gunnari* та *Nototheniidae* Антарктичного регіону, який включав етап екстракції колагену та подальший його гідроліз з використанням фракції серинових протеїназ з ліофізату тканини антарктичної медузи, одержаної в ході реалізації попереднього етапу роботи.

Автором проведено комплексне дослідження біологічних ефектів пептидів колагену з молекулярною масою нижче 5 кДа на моделі ожиріння у щурів та встановлено, що споживання фрагментів колагену обумовлювало покращення загального метаболічного статусу, що виявлялося у зниженні динаміки зростання маси тіла; зниженні потягу тварин до споживання висококалорійного корму; нормалізації показників, що асоційовані з розвитком переддіабетичного стану (концентрація глюкози, рівень глікозильованого гемоглобіну, відносний вміст інсуліну). Встановлено також, що споживання пептидів колагену сприяло покращенню структурно-функціонального стану жирової тканини та зниженню відносного вмісту прозапальних цитокінів та тлі підвищення вмісту деяких протизапальних цитокінів.

На основі аналізу показників, що характерні для патогенезу ожиріння, гістологічної оцінки стану жирової та показників, що асоційовані з виникненням стану інсулінорезистентності, автор робить висновок про коригуючий вплив пептидів колагену на розвиток ожиріння, спричинене споживанням висококалорійного корму.

Шляхом ферментативного гідролізу біомаси гідробіонту морського гребінця *A. colbecki* автором отримано фракцію пептидів, що виявляли антиоксидантні властивості, підтвержені у тесті визначення загальної антиоксидантної активності. Споживання тваринами з моделлю ожиріння фракції гідролізних пептидів сприяло нормалізації прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, що виявлялося у зниженні сироваткового рівня первинних, проміжних та кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів, продуктів окиснювальної модифікації білків на тлі підвищення супероксиддисмутазної активності та зростання вмісту загальних сульфгідрильних груп.

Автор надає доказову базу можливого профілактичного ефекту гідролізних пептидів з гідробіонту морського гребінця на моделі ожиріння щурів, який реалізується через вплив на функціонування периферійної сертонінергічної системи, зокрема, зниження концентрації сироваткового серотоніну у тварин з ожирінням, що споживали гідролізні пептиди та нормалізацію прооксидантно-антиоксидантного балансу.

Одержані результати є досить перспективними з позицій можливого застосування пептидів з морського гребінця як основи для створення

функціональних продуктів харчування або, у випадку очищення та виділення з-поміж суміші пептидів конкретних молекул, що виявляють вплив на функціонування периферійної серотонінергічної системи, і про створення препаратів для корекції порушень за ожиріння.

Також у розділі представлено дані дослідження антиоксидантних властивостей ендогенних пептидів з антарктичних гідробіонтів - криля *E. superba* та медузи *D. antarctica*, їх здатності впливати на прояв функціональної активності окремих факторів системи гемостазу.

Автором оптимізовано метод одержання ендогенних пептидів з антарктичних гідробіонтів - криля та медузи, який поєднував етапи поступового осадження високомолекулярних білків спочатку 0,6 М хлорною кислотою, а потім 67 % етиловим спиртом та подальше доочищення методом ультрафільтрації на мембранах з відсікаючою здатністю 10 кДа. Такий підхід дозволив отримати фракцію ендогенних пептидів з молекулярною масою до 5 кДа. Виявлено антиоксидантну та мембранопротекторну активність ендогенних пептидів з антарктичного криля. Встановлено модулюючий вплив ендогенних пептидів з криля та медузи на здатність тромбіну перетворювати фібриноген у фібрин, а також показано їх здатність пришвидшувати процес полімеризації плазми крові в експериментах *in vitro*. Виявлено здатність пептидів з криля викликати агрегацію тромбоцитів та впливати на секреторну функцію ендотеліоцитів. Результати щодо впливу пептидів з криля на секреторну активність ендотеліоцитів відкривають певні перспективи їхнього використання для корекції чи терапії порушень спричинених ендотеліальною дисфункцією та як можливих засобів направленої регуляції гемостатичного балансу.

Узагальнюючи результати, отримані в ході вирішення завдань п'ятого розділу щодо доцільності використання гідробіонтів Антарктичного регіону, як можливого джерела одержання біологічно-активних пептидів з метою їх використання як складових засобів профілактики чи корекції розвитку ускладнень за різних патологій, автор рекомендує застосування апробованих у роботі підходів валоризації відходів чи використання некондиційної сировини задля одержання біотехнологічної продукції з доданою вартістю.

Шостий (заключний) розділ містить узагальнення результатів дисертаційного дослідження. Автором дисертаційної роботи зроблено висновки щодо актуальності та доцільності наукових досліджень у напрямку пошуку альтернативних джерел сировини для одержання природних молекул, а також розроблення технологій, які сприятимуть максимально повному використанню вихідної сировини чи включенню в технологічний цикл відходів, отриманих в інших галузях промисловості, що є однією з вагомих задач сьогодення в тому числі й біотехнології. Також пропонується підхід щодо часткового вирішення окреслених вище проблем, зокрема, обґрунтовується перспективність

використання малоцінних та інвазивних видів гідробіонтів як можливого альтернативного джерела молекул для створення інноваційних біотехнологічних продуктів різного спектру біологічної дії.

Автор акцентує увагу на необхідності впровадження раціональних підходів щодо використання білоквмісної сировини і на прикладі власних результатів доводить доцільність розширення сировинної бази за рахунок залучення гідробіонтів Антарктичного регіону, які на сьогодні є недооціненим ресурсом. Використання гідробіонтів як сировинного ресурсу є економічно рентабельним з огляду на їх розповсюдженість, видове розмаїття, чисельність і швидкі темпи відтворюваності, а також нижчі ризики контамінації вихідної сировини збудниками, що типові для матеріалу з теплокровних тварин.

Разом з тим, Україна, маючи квоти на промисел в регіоні, має максимально повно використовувати доступні ресурси, а відтак перебудувати стратегію щодо використання біологічного потенціалу Антарктичного регіону. Дисертант акцентує увагу на важливості та необхідності розробки науково-обґрунтованого методологічного інструментарію комплексної та раціональної переробки морських гідробіонтів як одного з пріоритетних напрямків науково-технологічного розвитку країни і пропонує безпосередні рішення у вигляді розробленої методології очищення низки біотехнологічно перспективних молекул білкової природи для створення безпечних та ефективних фармакологічних засобів. Апробовані у роботі методи вилучення та очищення цільових молекул інтегровано у загальний методологічний підхід, який можна використовувати для комплексного одержання з одного об'єкту всього спектру білкових молекул. Це дозволить максимально повністю використовувати сировину, мінімізувати накопичення відходів і досягти у такий спосіб більшого економічного ефекту, зниження кількості відходів сприятиме покращенню санітарного та екологічного стану довкілля.

З іншого боку, запропоновану автором технологію можна поділити на окремі блоки, які у залежності від потреб та цілей можна використовувати для отримання окремих білкових молекул, у тому числі, серинових чи фібрино(гено)літичних ферментів, колагену чи пептидів. З метою масштабування процесу одержання молекул білкової природи з гідробіонтів та забезпечення максимальної економічної ефективності запропонованих підходів автором запропоновано оптимізувати методологічні підходи очищення цільових білкових молекул – протеолітичних ферментів різної субстратної специфічності, колагену та його низькомолекулярних фрагментів, фракцій біологічно активних пептидів з урахуванням особливостей сировини певного типу, зокрема, різних видів гідробіонтів Антарктичного регіону чи гідробіонтів інших кліматичних зон, що у широкому сенсі передбачає створення комплексної технології отримання кінцевого продукту.

Запропонована у дисертаційній роботі технологія створення біотехнологічного продукту, що включає використання відходів переробки основної сировини, як джерела для одержання цільових молекул, відповідає принципам економіки замкнутого циклу (або циркулярної економіки) та сприяє реалізації цілей Національної стратегії поводження з відходами у рамках Стратегії сталого розвитку України до 2030 року.

Наукова новизна отриманих результатів. Наукову новизну дисертаційної роботи можна охарактеризувати з декількох позицій. Так, автором вперше проведено дослідження гідробіонтів Антарктичного регіону як об'єктів, що можуть слугувати джерелом ферментів для біотехнологічних цілей і, що примітно, основний акцент дослідження зроблено на можливості використання непромислових видів чи потенційно інвазивних видів, тобто видів, яким на сьогодні приділяється мало уваги. В роботі пропонується комплексне технологічне рішення для отримання з білоквмісної сировини, на прикладі гідробіонтів, ферментів та пептидів, які можуть знайти застосування у медицині чи слугувати прототипом для створення засобів для корекції патологічних станів, що супроводжуються розвитком інсулінорезистентності, порушенням енергетичного гомеостазу через зміни у функціонуванні периферійної серотонінергічної системи. Вперше з гідробіонтів Антарктичного регіону очищено фібрино(гено)літичні ферменти та трипсиноподібний фермент, проаналізовано їх деякі фізико-хімічні і каталітичні властивості. Отримані в роботі результати дослідження кінетичних характеристик трипсиноподібного ферменту вносять певний вклад у розуміння ролі протеолітичних ферментів у механізмах біохімічної адаптації організмів, адаптованих до понижених температур середовища існування.

Одержані у дисертації дані є певним доробком у галузі еволюційної біохімії, оскільки сприяють кращому розумінню молекулярних основ еволюції ферментів, а також можуть бути використані у білковій інженерії під час конструювання молекул із заданими властивостями, характеристики яких би відповідали параметрам біотехнологічного процесу.

Практичне значення одержаних результатів. Робота має безсумнівне практичне спрямування так, як результати по дослідженню ефектів пептидів з гідробіонтів на розвиток ожиріння, спричиненого споживанням висококалорійного корму, відкривають перспективи їх використання як можливих засобів для корекції ваги у осіб з ожирінням, що, беручи до уваги, стрімкі темпи поширення цього захворювання та зростання частки населення молодого віку, що страждають на ожиріння, є актуальним. Детальне вивчення протеїназ з гідробіонтів важливе не лише для кращого розуміння молекулярних механізмів біохімічної адаптації та еволюції ферментів, а й має цілком практичний аспект. Невпинний ріст серцево-судинних патологій викликає необхідність розширення

арсеналу лікарських засобів, здатних впливати на функціонування системи гомеостазу. В асортименті тромболітичних препаратів, представлених на фармакологічному ринку нашої країни, вкрай низька частка конкурентоспроможних засобів вітчизняного виробництва. Тому пошук нових джерел сировини для створення доступних ліків не втрачає своєї актуальності та відповідає стратегії держави в галузі охорони здоров'я. З цих позицій, фібрино(гено)літичні ферменти можуть бути використані як фармацевтичні субстанції та слугувати вихідними сполуками під час створення лікарських засобів з покращеними фармакологічними характеристиками.

Ще одним вагомим практичним аспектом роботи є запропонований та апробований в рамках дисертаційної роботи підхід щодо переробки відходів рибної промисловості у низку продуктів (колаген, його гідролізати чи пептиди) як компонентів препаратів ранозагоювальної дії для лікування інфікованих та гнійно-некротичних уражень шкіри та м'яких тканин, створення профілактично-лікувальних гідролізатів ферментів, на які на сьогодні існує стабільний попит.

Такий підхід дозволяє одночасно вирішувати декілька стратегічно важливих задач – може бути частиною комплексної державної програми впровадження системного підходу щодо максимальної переробки та повторного використання відходів промисловості задля зниження рівня забрудненості та закладає підґрунтя для створення конкурентоспроможної продукції вітчизняного виробництва для заміщення імпортованих лікувальних засобів та забезпечення населення України якісними і доступними за ціною препаратами.

Ступінь обґрунтованості і вірогідності наукових досліджень та висновків дисертаційної роботи. Дисертаційна робота Ракші Н.Г. є цілісним завершеним науковим дослідженням, виконаним на високому методичному рівні з використанням широкого арсеналу сучасних методів, що дозволило досягти сформульованої мети та вирішити всі завдання, передбачені у роботі.

Так, було використано методи афінної, іонообмінної хроматографії та хроматографії, що поділяє за розмірами; низку електрофоретичних методів дослідження білків, зокрема, електрофорез в поліакриламідному гелі за денатуруючих умов, ензим-електрофорез, 2Д-електрофорез; гістохімічні методи; агрегатометрію та протокову цитометрію; імуноферментний аналіз; спектрофотометричні методи визначення вмісту окремих сполук та активності ферментів, а також хронометричні тести та методи математичної статистики.

Текст дисертаційної роботи написано науковим стилем, викладення матеріалу зрозуміле і логічне, експериментальні дані проілюстровані. Достовірність одержаних результатів підтверджується великим масивом експериментальних даних, їх належним статистичним аналізом і не викликає сумнівів. Висновки і положення, наведені у роботі, є логічним наслідком результатів, отриманих у ході виконання роботи і повністю відповідають меті та завданням дослідження.

Повнота викладення основних наукових результатів роботи та апробація дисертації в опублікованих працях. Експериментальні дані, викладені у розділах (3-5), повною мірою оприлюднені у низці публікацій, які всебічно розкривають тематику розділів. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 35 наукових праць: 11 статей у фахових виданнях, затверджених МОН України; 3 статті у міжнародних фахових виданнях; 9 статей у виданнях, що індексуються міжнародними наукометричними базами даних Scopus (включаючи квартилі Q2 та Q3) та Web of Science; 2 розділи у монографіях, виданих закордонними видавництвами; 2 патенти на корисну модель; 8 матеріалів і тез доповідей на наукових конференціях та з'їздах.

Ідентичність реферату та основних положень дисертації. Дисертацію та реферат оформлено відповідно до вимог МОН України. Реферат викладено у науковому стилі літературною мовою. Він повною мірою відображає зміст дисертації, структуру та основні положення. Зміст реферату ідентичний основним положенням дисертації та стисло відображає її зміст.

Запитання і зауваження. У цілому матеріали у дисертаційній роботі викладено логічно, послідовно і з необхідним ступенем деталізації.

Разом з тим, під час ознайомлення з дисертаційною роботою виникли окремі зауваження та запитання для наукової дискусії, які жодним чином не впливають на позитивну оцінку роботи і не знижують її теоретичну та практичну значність, але потребують уточнення.

1. У першому оглядовому розділі дисертаційної роботи автору слід було б навести дані світової літератури щодо препаратів білкового походження з антарктичних організмів, які застосовуються в агропромисловій галузі.
2. У підрозділі 1.3 першого розділу автору слід було б зробити виправлення замість некоректного терміна «психрофільні ферменти» на більш коректний термін «ферменти психрофільних організмів».
3. У другому розділі «Матеріали та методи дослідження». Підрозділи 2.15, 2.17 та 2.18: як обирали концентрацію пептидів для дослідження їх біологічної активності на моделях *in vitro*? Підрозділи 2.19.1 та 2.19.2: якої вікової групи були тварини, на яких проводилось дослідження впливу пептидів колагену на чинники виникнення порушень метаболізму на моделі ожиріння *in vivo*, а також дослідження композицій на основі колагену як потенційного ранозагоювального засобу на моделі вирізаних площинних ран *in vivo*? Чи не було різниці у віці між дослідних та експериментальних тварин та чи не проводилось дослідження залежності терапевтичного ефекту тестованих сполук від вікових особливостей тварин та від концентрацій застосованих композицій на основі колагену для обробки поверхні ран?
4. У третьому розділі у коментарях до таблиці 3.3 автору слід було б зазначити, за застосуванням якого саме інгібітору серинових протеїназ та хелатору металів

встановлено, що більшість ферментів у тканинах гідробіонтів Антарктичного регіону належить до серинових протеаз?

5. В ілюстративних матеріалах (таблиці і рисунки) четвертого та п'ятого розділів автору було б слід зазначити досліджувані концентрації та виробника матеріалів та реагентів, застосованих у роботі. Зокрема, у підрозділі 4.3 четвертого розділу на рис. 4.22 (Б) автору слід було б навести фотографії ензим-електрофореграми розділення білків фракції 1, що не зв'язалась з носієм, а також фракції 2, що містить фібрино(гено)літичні ферменти.

6. У п'ятому розділі на стор. 273 автору слід зазначити, які саме пептиди секретуються жировою тканиною та гормони кишківника, що мають вирішальне значення для гомеостатичного контролю маси тіла шляхом регулювання споживання їжі та витрат енергії згідно даних літератури?

7. У п'ятому розділі на стор. 280 дисертаційної роботи наведено припущення, що пов'язаний анорексогенний ефект пептидів з присутністю у складі пептидної суміші молекул, що є структурно подібними кишковим гормонам. Як на Вашу думку, чи можна пов'язати анорексогенний ефект пептидів також з їх здатністю взаємодіяти як ліганди з рецепторами клітин-мішеней кишківника та стимулювати біосинтез гормонів кишківника? Чи проводились автором дослідження впливу пептидів на рівень біосинтезу кишкових пептидних гормонів?

8. Виникають також запитання до шостого розділу, в якому автором представлені узагальнення результатів дисертаційного дослідження та визначені перспективи їх практичного використання. Як Ви вважаєте, чи має колаген, отриманий з луски риб Антарктичного регіону, якісь переваги над колагеном, який отримують з риб інших кліматичних зон в контексті біотехнологічного виробництва?

9. Як на Вашу думку, що перспективніше з точки зору впровадження у практику біотехнології – ендогенні пептиди чи «гідролізні» пептиди з досліджених Вами об'єктів?

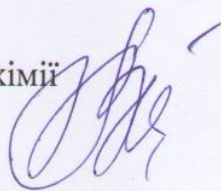
10. Які, на Ваш погляд, мають переваги отримані Вами фібрино(гено)літичні ферменти порівняно з «класичними» фібриногенолітиками з отрут змій? Чому, на Ваш погляд, в досліджуваних Вами об'єктах присутні ферменти з нетиповими для цих гідробіонтів активностями, як, наприклад, фібрино(гено)літичні ферменти?

11. По тексту дисертаційної роботи зустрічаються дрібні граматичні, стилістичні та друкарські помилки.

Загальний висновок і оцінка дисертації щодо її відповідності чинним вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук. За своєю актуальністю, новизною, обґрунтованими науковими результатами, визначенням перспективних практичних напрямів і повнотою представлення дисертаційна робота Ракші Наталії Григорівни «Розробка біотехнологічних підходів створення білкових інноваційних продуктів з гідробіонтів Антарктичного

регіону», подана на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертацій» та вимогам Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук, затвердженого Постановою Кабінету міністрів України від 17 листопада 2021 року №1197, а її автор Ракша Н.Г. заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент
доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
провідний науковий співробітник
відділу хімії біоактивних азотовмісних
гетероциклічних сполук
Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії
ім. В.П. Кухаря НАН України



Вікторія ЦИГАНКОВА

