

ВІДГУК

офіційного опонента Прилуцької Світлани Володимирівни 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 обраної теми дисертаційного дослідження.

Актуальність теми дослідження продиктована низкою чинників – з одного боку, є потреба у розробці ефективних засобів профілактично-лікувальної дії, як частини комплексної стратегії боротьби з розвитком ускладнень, що часто спостерігають в осіб з ожирінням, метаболічним синдромом, діабетом 2-го типу тощо. Динаміка розповсюдження цих захворювань серед різних верств населення, незалежно від соціальної приналежності, місця проживання, віку та статі, виводить проблему на рівень соціально важливих та потребує новаторських рішень у підходах щодо профілактики і лікування цієї патології. Одним з перспективних напрямків в області створення нових фармакологічних препаратів є розробка засобів на основі білкових молекул і пептидів. Інтерес до таких препаратів стабільно зростає, з'являється багато рекомендацій, розробок і наукових публікацій щодо створення нових біотехнологічних продуктів на основі білків і пептидів, отриманих не лише як цільовий, але й побічний продукт під час переробки основної сировини. Отже, розробка біотехнологічних підходів створення білкових інноваційних продуктів є актуальним завданням, оскільки відповідає існуючим на сьогодні запитам на продукцію на основі природних молекул.

Разом з тим, інтенсифікація виробництв та розширення тих сегментів промисловості, що передбачають активне використання ферментів, зростання частки продукції на основі ферментів, спонукають до пошуку

нових економічно обґрунтованих джерел сировини та розробки і впровадження технологій, які забезпечать максимально повне та ефективно використання сировини і залучення у технологічний процес відходів, що накопичуються у процесі переробки сировини і, зазвичай, відкидаються як побічні продукти.

Враховуючи вище окреслене, можемо стверджувати, що дисертаційне дослідження Ракші Н.Г. є актуальним, відповідає сучасним тенденціям і потребам та належить до сфери державних інтересів, оскільки спрямоване на вирішення нагальної і важливої проблеми – розробку і створення конкурентоспроможних вітчизняних засобів, здатних профілактично впливати на розвиток ожиріння, сприяючи нормалізації метаболічних порушень і попереджуючи, таким чином, розвиток супутніх захворювань.

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

Дисертаційна робота Ракші Н.Г. виконана на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідних тем «Механізми реалізації адаптаційно компенсаторних реакцій організму за умови 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. Розділи дисертації включають теоретичний і практичний аспекти дослідження, кожен розділ експериментальної частини роботи присвячено вирішенню певного завдання, що у кінцевому результаті забезпечує досягнення сформульованої мети. Робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень, узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел і додатків. Дисертація викладена на 350 сторінках, з них основна частина займає 266 сторінок, робота містить 29 таблиць та проілюстрована 70 рисунками. Бібліографічний список нараховує 441 літературне джерело.

Вступ дисертаційної роботи написаний чітко і лаконічно, у ньому достатньою обгрунтовано актуальність дисертаційної роботи, сформульовано мету і завдання досліджень, наведено зв'язок роботи з науковими програмами, висвітлено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів, проінформовано щодо особистого внеску здобувача та апробації результатів досліджень.

Аналіз літератури з проблематики дослідження викладено у трьох підрозділах, де авторка приділяє увагу дослідженню тенденцій на ринку

препаратів на основі білкових молекул та детальніше зупиняється на засобах, які як діючу складову містять пептиди з гідробіонтів; наводить узагальнену інформацію щодо основних підходів очищення білкових молекул та окреслює переваги і перспективи використання гідробіонтів як можливого джерела для одержання біологічно-активних сполук, ферментів та структурних молекул для їх впровадження у виробництво чи застосування у медицині. Інформативний і добре структурований розділ «Огляд літератури» обґрунтовує мету дисертаційного дослідження та сформульовані завдання.

Розділ «Матеріали та методи дослідження» включає перелік методів, які авторка використала для очищення з тканини гідробіонтів чи відходів рибної промисловості (на прикладі луски) цільових молекул (ферментів, колагену, пептидних фракцій); у розділі наведено методи оцінки біологічних ефектів отриманих білкових молекул та пептидів в експериментах *in vitro* та *in vivo*; представлено дизайн експериментів по відтворенню у щурів моделі ожиріння та створення вирізаних площинних ран; наведено методи статистичного опрацювання отриманих результатів.

Оригінальні результати, отримані авторкою, представлено у трьох розділах та обговоренні. Слід відмітити логічне та послідовне викладення матеріалу, ґрунтовне пояснення отриманих авторкою даних. У розділі 3 проведено оцінку потенціалу різних видів гідробіонтів Антарктичного регіону як можливого альтернативного сировинного ресурсу для одержання низки протеолітичних ферментів та фракції біологічно-активних пептидів. Згідно результатів оцінки білкового складу та визначення протеолітичної активності дисертантка обґрунтувала доцільність використання біологічного ресурсу Антарктичного регіону на прикладі малоцінних непромислових видів, потенційно інвазійних видів, видів нерибного промислу та надала рекомендації щодо використання того чи іншого виду як джерела для одержання фракції серинових протеїназ чи

фібрино(гено)літичних ферментів. Експериментальні результати, представлені у четвертому розділі, стосуються оптимізації та апробації методів одержання біотехнологічно перспективних ферментів на прикладі очищення серинових протеїназ, фібрино(гено)літичних ферментів та трипсиноподібного ферменту; наведено результати вивчення їх деяких фізико-хімічних властивостей, які можуть становити інтерес з позицій практичного застосування ферментів у різних сферах промисловості чи медицини; виявлено вплив фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів на процес полімеризації фібриногену, процес АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів, час зсідання плазми крові у хронометричних тестах, що вказує на їх антикоагуляційний потенціал і можливість застосування як засобів діагностики і профілактики патологічних змін у системі гемостазу. У п'ятому розділі наведено результати дослідження біологічної активності ендогенних пептидів, виділених з гідробіонтів *E. superba* та *D. antarctica*, пептидів, отриманих шляхом гідролізу колагену з луски риб Антарктичного регіону та гідролізних пептидів з гідробіонту *A. colbecki*. Виявлено модулюючий ефект пептидів колагену на низку показників, характерних для ожиріння, і тих, що слугують предикторами розвитку стану інсулінорезистентності та діабету 2-го типу. Виявлено зниження ступеню запального процесу і покращення структурно-функціонального стану жирової тканини, зокрема зниження рівня фіброзу за споживання тваринами з ожирінням пептидів колагену. Встановлено, що фракція ендогенних пептидів з тканин *E. superba* містить молекули, які проявляють антиоксидантні властивості, а також молекули, здатні впливати на окремі фактори коагуляційної та судинно-тромбоцитарної ланок системи гемостазу.

У шостому заключному розділі авторка узагальнила одержані результати та запропонувала загальний методологічний підхід створення технологій інноваційних продуктів на основі білкових молекул, який може

бути рекомендовано для впровадження у пілотне біотехнологічне виробництво одержання цільових білкових молекул з білоквмісної сировини різного походження.

Текст дисертаційної роботи написано науковим стилем, викладення матеріалу зрозуміле і логічне, робота добре ілюстрована, що полегшує сприйняття викладеного матеріалу. У роботі відсутні порушення академічної доброчесності. Дисертаційна робота Ракші Н.Г. відповідає спеціальності 03.00.20 – біотехнологія.

Ідентичність реферату та основних положень дисертації. Автореферат у повному обсязі відображає матеріали дисертаційної роботи. Основні положення і висновки є ідентичними у дисертації та авторефераті. Дисертацію та реферат оформлено відповідно до вимог МОН України.

Наукова новизна отриманих результатів. Автором вперше проведено комплексну оцінку біотехнологічного потенціалу гідробіонтів Антарктичного регіону та запропоновано підходи щодо використання біологічних ресурсів регіону на прикладі гідробіонтів. Результати, отримані у дисертаційній роботі, можуть стати основою для розробки ефективної технології переробки білоквмісних відходів промисловості чи використання непромислових видів гідробіонтів, як джерела молекул білкової природи чи пептидів, для створення засобів корекції порушень метаболізму, спричинених розвитком оксидативного стресу, а також препаратів на основі колагену з гідробіонтів, що проявляють ранозагоювальні властивості.

Вперше, як джерело фібрино(гено)літичних ферментів, використано гідробіонти Антарктичного регіону та виявлено, що очищені ферменти специфічно розщеплюють фібриноген, порушуючи у такий спосіб здатність останнього до полімеризації у відповідь на дію тромбіну. Вперше охарактеризовано фізико-хімічні властивості серинових протеїназ з *D. antarctica* і трипсиноподібного ферменту з *A. Colbecki*. Отримані

результати розширюють існуючі уявлення щодо властивостей ферментів з організмів, які функціонують за понижених температур навколишнього середовища.

Наукова новизна дисертаційної роботи підтверджена патентами України на корисну модель №u202106489 «Спосіб отримання трипсиноподібного ферменту з екстракту тканин медузи *D. Antarctica*» та № u202106490 «Спосіб отримання фібрино(гено)літичного ферменту з екстракту тканин морського гребінця».

Теоретично обґрунтовано та експериментально підтверджено доцільність підходу переробки луски риб у колаген, а далі у пептиди колагену, що дозволяє одержати фракцію пептидів з вираженим коригуючим ефектом щодо ожиріння. Пептиди колагену та пептиди, отримані шляхом ферментативного гідролізу екстракту тканини гідробіонтів, у перспективі, проявляючи чисельні позитивні ефекти, підтверджені на моделях *in vivo*, можуть бути використані як окремо, так і у складі функціональних продуктів харчування, які охоплюють широке коло споживачів.

Практичне значення одержаних результатів. Перспектива практичного використання результатів роботи не викликає сумнівів. Сукупність даних, що представлені у роботі, може бути основою для розробки ефективної технології виробництва функціональних харчових добавок для корекції метаболічних порушень за ожиріння та засобів зниження ваги у осіб з цим захворюванням.

Авторка пропонує комплексний алгоритм, підтверджений достатнім масивом експериментальних даних щодо отримання цільових білкових молекул сировини, який безумовно становить практичний інтерес. Напрацьовані методологічні підходи у подальшому можуть бути застосовані для одержання біологічно активних речовин не лише з гідробіотів Антарктичного регіону, а й з будь-якої білоквмісної сировини.

Очищені та охарактеризовані фібрино(гено)літичні ферменти можуть бути використані як основа для створення ефективних профілактично-лікувальних засобів, компонентів біологічно активних добавок з перспективою подальшого впровадження на фармакологічний ринок України з метою часткового заміщення імпортованих препаратів аналогічного спектру дії. Властивість трипсиноподібного ферменту зберігати активність при +8 °С та за температурного оптимуму +24 °С є доволі перспективною характеристикою з позиції потенційного використання ферменту у біотехнологічних виробництвах, що потребують нижчих температур перебігу процесу.

Ступінь обґрунтованості і вірогідності наукових досліджень та висновків дисертаційної роботи. Дослідження Ракші Н.Г. виконане на сучасному науковому рівні, що свідчить про високий рівень знань, теоретичної та практичної підготовки дисертантки. Наукові положення і висновки не викликають сумнівів, оскільки ґрунтуються на значній кількості експериментів, виконаних з використанням широкого арсеналу методів із застосуванням сучасного лабораторного обладнання кафедри біохімії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Зокрема, у роботі використано методи білкової хімії - афінну хроматографію на бензамідин-сефарозі, СІТ-сефарозі, голубій сефарозі, іонобмінну хроматографію на КМ- та ДЕАЕ-сефарозі, хроматографію, що поділяє за розмірами з використанням різних носіїв; електрофорез за денатуруючих умов та за відновлювальних умов, 2Д-електрофорез та ензим-електрофорез, а також спектрофотометричні методи, імуноферментний аналіз, гістологічні методи, протокову цитометрію, агрегатометрію та методи статистичної обробки даних.

Повнота викладення основних наукових результатів роботи та апробація дисертації в опублікованих працях. Результати

експериментальних досліджень авторки, основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи висвітлено у 35 наукових працях, у тому числі 11 статтях у наукових фахових виданнях України, 3 статтях у міжнародних фахових виданнях, 9 статтях у виданнях, що включені до міжнародних наукометричних баз даних Scopus (включаючи Q2-Q3) та Web of Science. Результати роботи відображено у 2 розділах монографій, виданих закордонними видавництвами, одержано 2 патенти України на корисну модель.

Не зважаючи на загальну позитивну оцінку дисертації під час ознайомлення з роботою виникли деякі запитання дискусійного характеру та зауваження:

1. Чи впливають хроматографічні носії на активні центри протеолітичних ферментів, адже відомо, що ферменти є чутливими до змін температурних умов і значення рН?
2. Який механізм протизапальної і превентивної від ожиріння дії пептидів колагену з ММ <5 кДа?
3. Як пояснити антиоксидантну і мембрано протекторну дію пептидів на тлі підвищення активності СОД і каталази?
4. Етап ліофілізації є фінансово затратним методом та потребує використання спеціального обладнання. Чи можливо замінити етап ліофілізації вихідного матеріалу під час отримання сировини для подальшого хроматографічного розподілу і очищення цільових білкових молекул?
5. Чи є можливою розробка рекомбінантних аналогів отриманих пептидів порівняно з природніми молекулами в рамках запропонованих біотехнологічних підходів?
6. Чи можуть запропоновані технології отримання білкових молекул і пептидів з гідробіонтів використовуватися для інших кліматичних зон? У

чому полягає унікальність запропонованих інноваційних технологій отримання білкових продуктів?

7. Яка економічна ефективність запропонованих технологій отримання і очищення білкових продуктів з морських гідробіонтів?

8. У назві методу 2.11 «Визначення активності фібрино(гено)літичних ферментів...» коректніше писати «Оцінка специфічності фібрино(гено)літичних ферментів щодо ланцюгів фібриногену», адже авторка не визначає активності ферментів.

9. Іноді в тексті дисертації трапляються стилістичні та граматичні помилки, невдалі або не точні висловлювання. Для прикладу, описуючи процедури очищення ферментів методами хроматографії, автор зазначає «фракція, елюйована з використанням буферу», проте стилістично коректнішим було б написати «фракція, елюйована буфером». Або, підпис до рис. 4.25 «Хроматограми розділення ліофілізатів тканин *S. neumayeri* (А), *P. corrugatus* (Б) та *O. validus* (В) методом афінної хроматографії на блакитній сефарозі» краще перефразувати як «Хроматограми очищення фібрино(гено)літичних ферментів з *S. neumayeri* (А), *P. corrugatus* (Б) та *O. validus* (В) методом афінної хроматографії на блакитній сефарозі» чи «Хроматограми розділення білків екстрактів тканин *S. neumayeri* (А), *P. corrugatus* (Б) та *O. validus* (В) методом афінної хроматографії на блакитній сефарозі».

10. У роботі часто спочатку представлено рисунок чи таблиця, а вже потім опис результатів, що ускладнює сприйняття матеріалу.


Однак вказані зауваження не зменшують наукової значущості та практичної цінності результатів дисертаційної роботи Ракші Н.Г.

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 авторка, Ракша Наталія Григорівна, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук зі спеціальності 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук, професор,
завідувач кафедри фізіології, біохімії рослин та біоенергетики
Національного університету біоресурсів
і природокористування України



Світлана ПРИЛУЦЬКА

