

ВІДГУК
офіційного опонента про дисертацію
Грабовського Степана Стефановича
« АДАПТОГЕННИЙ ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ПРЕПАРАТУ
СЕЛЕЗІНКИ ЗА УМОВ СТРЕСУ ТВАРИН ПЕРЕД ЗАБОЄМ»
представлену на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук
за спеціальністю 03.00.04 - біохімія

В розвинутих країнах виникнення хронічних захворювань людей частково або повністю залежить від неправильного харчування і, безумовно, складає найсерйознішу проблему галузі охорони здоров'я.

Основна увага науковців при визначенні поняття повноцінного харчування приділяється потраплянню в організм людини оптимальної кількості білків, жирів, вуглеводів, мінеральних речовин, вітамінів тощо. У науковій літературі достатньо добре висвітлено метаболічні порушення та зміни у функціонуванні імунної системи, пов'язані з дією харчових речовин на молекулярному і клітинному рівні. При дослідженні проблеми впливу продуктів харчування на ризик виникнення патологічних процесів акцент робиться лише на вмісті в їжі холестеролу, барвників, консервантів, харчової солі тощо. При цьому зовсім не звертається увага на стан організму тварин перед забоєм та вплив передзабійного стресу на їхні біохімічні параметри. Зміни якості тваринної сировини за стресорного впливу згодом можуть негативно вплинути і на здоров'я споживачів.

Стратегією поведінки вищих хребетних у стресовій ситуації є активна (агресія і втеча) та пасивна (завмирання) реакції. Але жодна з цих форм відповіді не співвідноситься зі станом тварин перед забоєм, коли вони мають відчуття не просто небезпеки, а безвихідного становища.

М'ясо від таких тварин в спеціальній літературі характеризується як «бліде», «м'яке», «водянисте» або «темне», «щільне», «сухе». Катехоламіни, які виділяються за тривожного стану, є активаторами обміну речовин в м'язах і пришвидшують використання макроергів. Недостатність аденозинтрифосфату і креатинфосфату має наслідком втрату еластичності

м'язових волокон і викликає передчасне їх залякання. Аденозинфосфат, який на момент забою міститься у м'язах в достатній кількості, утворює сполуки з іонами кальцію та магнію, що підвищує властивість тканини утримувати воду. У тварин, які незадовго до забою, наприклад, під час транспортування, піддавались фізичному та психологічному навантаженню, порушувались обмінні процеси у м'язах. При цьому було встановлено, що за активації гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової ланки суттєво підвищується рівень катаболічних процесів.

Поліаміни – важливі продукти декарбоксілювання амінокислот, відіграють важливу роль в регуляції численних метаболічних процесів, зокрема, біосинтезі протеїнів і нуклеотидів, який зазнає істотних змін за дії на організм стресорних чинників. Внаслідок специфічних фізико-хімічних властивостей поліаміни виконують функції адаптогенів, впливаючи на інтенсивність вільнорадикальних реакцій перекисного окиснення ліпідів, активність ряду ензимів, стан біомембран. Важливим джерелом поліамінів з тваринної сировини є селезінка. Окрім поліамінів, селезінка містить в значних кількостях широкий спектр біологічно-активних речовин, зокрема унікальні фосфоліпіди та амінокислоти. Є вагомим підставити, що використання активних в біохімічному сенсі добавок до раціону тварин перед забоем спроможне вплинути на інтенсивність реакції на стрес та покращити якість м'яса.

Отже, передзабійний стан тварин призводить до змін на метаболічному рівні і, відповідно, має негативний вплив на якість м'ясної продукції і здоров'я споживачів. Тому мета дисертаційної роботи Грабовського Степана Стефановича - з'ясувати вплив біологічно активних речовин препарату селезінки на показники та стан імунної системи організму лабораторних і домашніх тварин за умов стресу перед забоем; на основі результатів біохімічних, морфометричних та імунологічних досліджень отримати експериментально обґрунтований, ефективний і доступний для використання препарат адаптогенної дії проти стресу, який виникає у передзабійний період

за умов технологічного процесу виробництва тваринної продукції, є актуальною і сучасною.

Структура рукопису відповідає класичній схемі. Він включає інформацію щодо сучасного стану проблеми та ряду нез'ясованих питань, опис методичних підходів автора, наведено результати власних досліджень із відповідним обговоренням. Текст дисертаційної роботи закінчується висновками та списком використаної літератури.

Розділ «Огляд літератури» містить ґрунтовний аналіз сучасних даних з таких проблем, як: загальна характеристика стресу та аналіз стрес-реакції з фізіологічної, біохімічної та імунологічної точок зору; роль гормонів кори наднирників в адаптації організму тварин до дії стрес-факторів; особливості стресу домашніх тварин та його наслідки, передусім вплив на якість продукції. Значна частина розділу присвячена засобам попередження негативного впливу передзабійного стану тварин і, в першу чергу, значенню поліамінів в регуляції стресових реакцій, а також метаболізму та біохімічним властивостям цих сполук.

В розділі «Матеріали та методи досліджень» дано лаконічний опис сучасних адекватних поставленим задачам методів, які було використано дисертантом, зокрема біохімічних, імунологічних, морфологічних, цитологічних, гістологічних та інших. Наведено загальну схему досліджень, яка спрощує подальше сприйняття експериментального матеріалу. Зосереджена увага на роботі з щурами, кролями, бугайцями, кнурами та курами.

В розділі «Результати досліджень» автором викладено основні експериментальні результати із їхнім ґрунтовним аналізом. Зокрема, Грабовським С.С. зроблено наступне. Доведена доцільність використання ультразвукового приладу для екстрагування фракції селезінки тварин, яка збагачена поліамінами, фосфоліпідами та аргініном. За такої обробки утворюються суспензії, емульсії та проходить селективне руйнування клітин у суспензіях. Згодовування екстракту селезінки супроводжувалось підвищенням

загальної кількості поліамінів, а також збільшенням вмісту окремих із них, а саме сперміну, спермідину та путресцину у тканинах курчат-бройлерів.

Застосування екстракту селезінки нівелює характерні стресопосередковані зміни вмісту в організмі тварин стрес-гормонів, які мають місце після транспортування, перед забоєм. У бугайців за дії препарату «Сплінактив» концентрація АКТГ, кортизолу, альдостерону суттєво зменшується. В плазмі крові курчат-бройлерів, які з кормом отримували екстракт селезінки, встановлено вірогідно нижчий рівень АКТГ, що може свідчити про зменшення інтенсивності стресу перед забоєм. Передзабійний стрес підвищує концентрацію естрогенів в плазмі крові цих птахів. Застосування екстрактів селезінки в якості антистресора знижує досліджуваний показник. У плазмі крові курчат, які з кормом отримували екстракт селезінки, встановлено вірогідно вищий рівень інсуліну порівняно з контролем, що може також свідчити про зменшення інтенсивності стрес-реакції перед забоєм. Рівень кортизолу у плазмі крові щурів та кроликів, які отримували екстракт селезінки, був вірогідно нижчим порівняно з тваринами контрольної групи, що вказує на антистресову дію поліамінів та, ймовірно, інших біологічно-активних компонентів препарату «Сплінактив». Слід особливо відмітити, що біологічна активність препаратів порівняння, а саме екстрактів ехінацеї з лимонником та пророслого зерна була менш вираженою.

Зареєстроване дисертантом зменшення активності аспарат- та аланінамінотрансфери в плазмі крові кролів говорить про розвиток стресу у цій групі тварин, а використання екстракту селезінки сприяло стимуляції цих ензимів. Поряд з цим, передзабійний стрес підвищує активність амінотрансфераз в плазмі крові курчат-бройлерів. Застосування екстрактів селезінки в якості антистресора знижує досліджуваний показник і покращує якість продукції від цієї птиці.

Введення піддослідним тваринам імуномодуляторів природного походження (екстрактів селезінки, ехінацеї, лимонника та пророщеного

зерна) мало корегувальний вплив на кількісні і функціональні показники Т- і В-клітинної ланки імунітету. Слід відмітити, що фізіологічно активні речовини, зокрема поліаміни, з екстракту селезінки мали найістотніший вплив на досліджувані параметри. Поліаміни стимулювали Т- і В-клітинний імунітет у щурів та кроликів перед забоєм. Зокрема, у кроликів зменшувалась кількість недиференційованих та мало диференційованих лімфоцитів. Підвищувалась резистентність організму бугайців, а саме зростала фагоцитарна активність крові, збільшувались фагоцитарний індекс та фагоцитарне число. Результати досліджень на курчатах-бройлерах вказують на те, що поліаміни з екстракту селезінки, діють як імуномодулятори та антистресори, підвищують резистентність організму, корегують та нівелюють вплив стресу.

За результатами гематологічних показників у тварин контрольної групи щурів та кнурів на тлі стресу спостерігалось зниження γ - та β -глобулінів, що свідчить про сповільнення процесів транспортування поживних речовин клітинам та зниження захисту організму від несприятливих чинників зовнішнього середовища. Препарат з екстрактів селезінки нормалізував цей показник. На тлі застосування «Сплінактиву» відбувається підвищення вмісту γ -глобулінів у плазмі крові курчат-бройлерів та бугайців, що вказує на зростання активності гуморальної ланки неспецифічної резистентності організму перед забоєм. Окрім того, спиртовий екстракт селезінки збільшує преальбумінову фракцію протеїнів плазми крові кроликів.

Виявлено нормалізуючий вплив біологічно-активних речовин, одержаних з екстракту селезінки із застосуванням ультразвуку, при передзабійному стресі на вміст окремих фракцій нейтральних ліпідів та підкласів фосфоліпідів у плазмі крові кроликів, кнурів, бугайців та курчат-бройлерів.

Хоча за умов передзабійного стресу не спостерігали істотних змін у морфоструктурі тканини підшлункової залози щурів, площа острівців Лангерганса була найбільшою у тварин, яким задавали екстракт селезінки. За

умов передзабійного стресу спостерігали істотні зміни надниркового морфогомеостазу, що проявлялося підвищенням функціональної активності кіркової та мозкової речовин надниркових залоз. Останнє обумовлено посиленням виділення глюкокортикоїдних гормонів за умов стресу. Найменш виражені зміни в надниркових залозах, спричинені передзабійним стресом, фіксували у групі тварин, яким додатково до корму додавали екстракт селезінки. У щурів контрольної групи відзначали набубнявіння, зернисту дистрофію гепатоцитів. Найменш виражені зміни у печінці було зафіксовано у групі лабораторних тварин, яким вводили екстракт селезінки. Використання досліджуваного препарату на фоні стресу також сприяло збільшенню площі лімфоїдних вузликів та білої пульпи селезінки і тим самим активізувало механізми адаптації організму тварин, порівняно з контрольною групою.

Використання антистресової кормової добавки сприяло збільшенню концентрації амінокислот у грудинці курей і тим самим підвищувало біологічну цінність м'яса птиці.

Споживання м'яса тварин, яким згодовували поліаміни, фосфоліпіди та аргінін з селезінки, призводить до підвищення індексу стимуляції нейтрофілів у крові людей та підвищує резистентність їх організму.

На основі комплексних біохімічних досліджень імунної системи, концентрації гормонів, протеїнового та ліпідного складу крові різних видів домашніх тварин, а також морфологічного аналізу деяких органів щурів Грабовським Степаном Стефановичем ідентифіковано особливий стан організму — передзабійний стрес. Біологічно-активні сполуки з екстракту селезінки нівелюють біохімічні зміни, спричинені передзабійним стресом у тварин, і таким чином сприяють поліпшенню якісних характеристик їх м'яса.

На основі результатів дисертаційної роботи запропоновано і запатентовано зручний у застосуванні спосіб підвищення ефективності екстрагування біологічно-активних речовин селезінки ультразвуком, що збільшує вихід кінцевих продуктів — поліамінів, фосфоліпідів та аргініну.

Розроблено і запатентовано новий ефективний спосіб нормалізації функцій клітинного імунітету, активації метаболізму, приросту маси тіла та нівелювання передзабійного стресу курчат-бройлерів та кроликів, що покращує якість м'яса.

Отже, теоретична і практична значущість роботи не викликає сумнівів.

Наведені в кінці роботи висновки впливають з завдань і є правомірними. Наведена коректна статистична обробка експериментальних даних. Рисунки демонстративні. Використано достатньо сучасні методи досліджень, які відповідають меті та завданням роботи. Експериментальні результати, що викладено в дисертації, опубліковані у відкритому друці у вигляді 50 публікацій, серед них 27 — у фахових виданнях, затверджених Департаментом атестації кадрів вищої кваліфікації Міністерства освіти і науки України, 3 — патенти України на винаходи та корисні моделі. Матеріали дисертаційної роботи доповідались на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях та з'їздах. Структура і написання дисертації відповідають вимогам ДАК МОН України. Результати досліджень ілюстровано 73 рисунками та 53 таблицями. Список літератури містить значну кількість сучасних посилань. Автореферат дисертації відображає основний зміст проведених досліджень.

До позитивних рис роботи можна віднести:

- високу практичну значущість дослідження, наявність конкретних рекомендацій щодо подальшого застосування результатів;
- якісно виготовлені гістологічні зразки;
- наявність висновків і узагальнюючих абзаців після кожного підрозділу експериментальної частини;
- якісно написаний літогляд.

Під час аналізу роботи виникли деякі зауваження та запитання.

Зауваження.

1. На мій погляд, назва дисертації звужує загальнобіологічний зміст представленої роботи.

2. В розділі «Актуальність теми» автореферату відсутні відомості щодо впливу поліамінів, фосфоліпідів та аргініну на обмін речовин та рівень стрес-гормонів. Втім, саме ці сполуки є активною складовою препарату «Сплінактив». В розділі «Наукова новизна» автореферату окремі, другорядні з моєї точки зору, числові показники, результати статобробки та припущення зайві.

3. Краще було б почати експериментальну частину з характеристики саме біохімічних показників у нормі та за передзабійного стресу і їхньої нормалізації за дії екстрактів селезінки.

4. В Вашій експериментальній роботі недостатньо, на мій погляд, приділено увагу аналізу біологічної дії власне етанолу, який у високих концентраціях міститься в біологічно-активних добавках.

5. Недоліком роботи є відсутність експериментів із застосуванням хімічно чистих препаратів поліамінів, фосфоліпідів та аргініну у якості порівняння з біохімічною активністю екстрактів селезінки. Не зовсім зрозуміло також, від якої саме хімічної речовини залежить протекторна активність Вашого препарату в першу чергу. Якщо це поліаміни, то треба було б це більш виразно відобразити у висновках роботи.

6. Розміщення контрольних стовпчиків з правого боку рисунків та таблиць дещо ускладнює сприйняття матеріалу.

7. Іноді при читанні рукопису не зовсім зрозуміло, що виступає контролем: відсутність стресу, чи дія стресу за введення протекторів.

8. Інколи аббревіатура не розшифровується у першому використанні.

Запитання:

1. Наскільки наявність генномодифікованих протеїнів, а також консервантів та барвників у м'ясній продукції більш або менш небезпечна, ніж хімічні зміни м'яса за передзабійного стресу?

2. Які фізико-хімічні механізми лежать в основі сприяння екстракції поліамінів, фосфатидилхоліну та аргініну селезінки із застосуванням ультразвуку?

3. Чи наявні суттєві якісні відмінності, з біохімічної точки зору, передзабійного стресу від стресів іншого генезу? Існує точка зору, що стресорна відповідь організмів має подібні характеристики, незалежно від природи фактору, який її спричинює.

4. Чи не вивчали Ви дію біологічно-активних добавок на біохімічні та гістологічні показники у випадку тварин, які не підлягали дії стресу?

5. Наскільки доцільно, з економічної точки зору, згодовувати тваринам перед забоєм екстракти селезінки, порівняно з протекторами рослинного чи синтетичного походження?

Наведені зауваження не знижують науково-практичну цінність проведеного дослідження. Характеризуючи роботу в цілому можна стверджувати, що вона відповідає профілю 03.00.04 - біохімія. За актуальністю досліджуваної теми, науковою новизною, теоретичною і практичною цінністю, об'ємом експериментального матеріалу, самостійного внеску автора і зроблених висновків дисертація є окремим завершеним дослідженням, яке вирішує наукову проблему, і відповідає вимогам пунктів 10 та 13 «Порядку присудження наукових ступенів» КМУ від 24 липня 2013 р. № 567. Вважаю, що Грабовський Степан Стефанович заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія.

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
провідний науковий співробітник
відділу біохімії м'язів

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України  Данилович Ю.В.

4.01.17 р.



Ю.В. Данилович
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
національної академії наук України
04 " 01 " 2017 р.