

## ВІДЗИВ ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу ДАНИЛОВИЧ ГАННИ ВІКТОРІВНИ  
«БІОСИНТЕЗ ТА РЕГУЛЯТОРНА РОЛЬ ОКСИДУ АЗОТУ  
В МІТОХОНДРІЯХ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА», поданої до захисту на  
здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04  
– Біохімія (Галузь знань 091 – Біологія)

Дисертаційна робота Данилович Г.В. присвячена **актуальній проблемі** – з'ясуванню ролі оксид азоту (NO) як сигнального чинника в клітинах, зокрема під час регулювання ним скоротливої функції гладеньких м'язів. Оскільки утворення NO і чутливість до нього знижуються наприкінці вагітності й на початку пологової активності, то отримані в роботі дисертантки дані мають важливе значення для вирішення проблем репродуктивної медицини. Сигнальні функції NO можуть бути залежними й від функціонування мітохондрій, які є основним депо  $\text{Ca}^{2+}$ -здатним підтримувати його фізіологічний рівень в цитозолі клітин. Тому з'ясування біохімічних механізмів контролювання оксидом азоту скоротливої функції гладеньких м'язів міометрію матки становить як науковий, так і прикладний інтерес для медицини і ветеринарії.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**  
Експериментальну частину дисертаційної роботи виконано протягом 2007-2021 рр відповідно до науково-дослідних тем відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України у рамках Проблеми “Біохімія тварин та людини” (2004 – 2008, 2009 – 2013, 2014 – 2018 і 2019 – 2023 рр), а також в рамках Проблеми “Вивчення геному, протеому та метаболому живих організмів та шляхів їх регуляції» (2017 – 2021 рр), в рамках Програми наукових досліджень НАН України “Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій” (2010-2014, 2012-2016, 2015-2019 рр), Програм ДФФД України (2007-2009, 2010-2012 рр), цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України “Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та

сільського господарства” (2015-2019 рр). Вражає перелік виконаних науково-дослідних там, в рамках яких була задіяна дисертантка, що, очевидно, свідчить про її працьовитість.

**Наукова новизна результатів** досліджень, проведених авторкою дисертаційної роботи, полягає, перш за все, у комплексному характері цих досліджень, зокрема зі з'ясування біохімічних механізмів біосинтезу оксиду азоту в мітохондріях гладеньких м'язів матки. Було охарактеризовано вплив калікс[4]аренів на біосинтез оксиду азоту і гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  та на біоенергетичні процеси в мітохондріях. Встановлено, як впливає NO на рівень  $\text{Ca}^{2+}$  в міоцитах матки і вивчено мембранні та іонні механізми, які можуть лежати в основі цього впливу. Для цього використано сучасний метод лазерної конфокальної мікроскопії із визначенням ко-локалізації специфічних флуоресцентних барвників і за дії специфічних моноклональних антитіл. Застосування як калікс[4]арену C-956 дозволило встановити його проникнення в цитоплазму клітин і взаємодію з мітохондріями, де згаданий чинник ефективно діяв на мембранний транспорт, зокрема інгібував  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, не впливаючи при цьому на енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$ . Цікавим для подальших досліджень є виявлена стимуляція калікс[4]ареном NO-синтазної активності мітохондрій. Важливо відзначити, що процеси, які регулюються за дії калікс[4]арену, не супроводжуються негативними побічними ефектами для функціонування мітохондрій. Отже цей біологічно активний чинник можна планувати для подальшого використання як регулятора вмісту оксиду азоту і функціонування мітохондрій в гладеньких м'язах міометрію.

**Науково-практична цінність роботи.** Експериментально встановлено, що оксид азоту може діяти на зниження вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі. Також охарактеризовані іонні механізми впливу NO на гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  в міоцитах на рівні плазматичної мембрани, на підставі чого можна проводити пошук донорів і попередників NO для створення нових токолітичних препаратів. Близькими до впровадження є результати впливу калікс[4]аренів на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ , синтез

оксиду азоту, функціональну активність електрон-транспортного ланцюга та електричний потенціал внутрішньої мембрани мітохондрій.

**Мета роботи** сформульована чітко і лаконічно.

**Методи дослідження**, застосовані під час виконання дисертаційної роботи, в цілому, адекватні спеціальності «біохімія», за якою відбувається захист. Крім того, дисертантка використала великий арсенал фізико-хімічних досліджень, що суттєво підвищило аргументацію виконаної роботи.

**Об'єкт і предмет дослідження** сформульовані правильно.

За результатами проведених досліджень зроблено **10 висновків**, які є конкретними, лаконічними і витікають з даних, наведених у дисертаційній роботі. Усі висновки чіткі і добре обгрунтовані (див. також зауваження).

**Особистий внесок здобувача.** У переважній більшості наукових статей за темою дисертаційної роботи Данилович Г.В. є 1-м, або 2-м автором у списку співавторів, що свідчить про її важливий вклад у виконання запланованих досліджень.

**Апробація результатів дисертації.** Апробація основних результатів дисертаційної роботи відбулася на 3-х останніх Українських біохімічних конгресах, а також на чисельних вітчизняних наукових конференціях, які відбувалися в Україні.

**У списку публікацій** за результатами дисертаційної роботи Данилович Г.В. числиться 1 монографія і 26 статей у фахових періодичних виданнях, з них 8 опубліковані у закордонних журналах 3-го і 4-го квартилю.

**Структура дисертаційної роботи** Данилович Г.В. – традиційна: Вступ, Огляд літератури, опис Матеріалів і методів дослідження, опис Результатів власних досліджень та їх обговорення, а також Узагальнення отриманих результатів дослідження, Висновки, Список використаних джерел літератури, що налічує 492 посилання. В роботі на 253 сторінках наведено 100 рисунків, 2 схеми і 5 таблиць. Представлення результатів дослідження у Розділі 3 здійснене

за послідовністю завдань роботи від 3.1 до 3.5. До кожного підрозділу зроблені вдалі узагальнення і наведене коротке обговорення отриманих результатів.

Розділ 1 «Огляд літератури» добре ілюстрований, що сприяє кращому сприйняттю головних напрямків проведеного дослідження. Матеріали і методи дослідження (24 стор.) описані детально і за знанням справи та наведенням ілюстрацій і розрахунків, що свідчить про добре володіння дисертанткою методології дослідження.

В цілому, дисертаційну роботу Данилович Г.В. слід оцінити позитивно, хоча до окремих її положень можна висловити **зауваження**, у т.ч. редакційні, а також поставити **запитання** і висловити **побажання**.

1. Рис. 3.1.1. «Ідентифікація синтезу оксиду азоту в міоцитах матки щурів з використанням NO-чутливого зонду...» названий неточно, бо насправді, авторка визначала продукт (оксид азоту), а не процес його синтезу.

2. У підписі до Рис. 3.1.2. «Зміни інтенсивності флуоресценції DAF-FM в міоциті...». Вказано  $M \pm m$ ,  $n=3-7$ , але не вказано  $P<????$  Це зауваження стосується й Рис. 3.1.4, 3.1.8, 3.1.12 і ряду інших рисунків.

3. Який стан питання з практичним впровадженням калікс[4]аренів – що відомо про їх біосумісність, гемосумісність, біорозподіл, кліренс, біодеградацію, і т.п. Що нового на цю тему було встановлено в дисертаційній роботі?

4. У передмові до Висновків (ст. 252) сказано: «Робота формує уявлення про мітохондрії як джерело оксиду азоту в гладеньком'язових клітинах матки та його значення у функціонуванні цих субклітинних структур». Питання - що принципово нового було досягнуто в цих уявленнях, необхідно більш чітко пояснити, що було невідомо до проведення досліджень в рамках дисертаційної роботи і що вдалося вперше встановити. Так, висновок 1 дисертаційної роботи звучить: «Доведена можливість утворення оксиду азоту в мітохондріях клітин гладенького м'язу матки». Хіба про це невідомо було раніше?

5. Чи враховувала дисертантка можливість перетворення оксиду азоту (NO) в активні форми азоту (RNS) - чи досліджувала вона таке перетворення?

6. Утворення Активних Форм Кисню (АФК) в ізольованих мітохондріях (МХ) дисертантка вивчала з використанням методу протокової цитофлуориметрії за флуоресценцією барвника DCF-DA. Проте цей метод не дозволяє виявляти активні форми нітрогену, які можуть утворюватися з оксиду азоту. Як показано в роботі, рівень оксиду азоту може індукуватися каліксаренами. Тому висновок дисертантки про «Відсутність впливу всіх досліджуваних калікс[4]аренів на утворення АФК в МХ може вказувати на користь того, що процеси, які активуються/гальмуються за їх присутності не призводять до шкідливих для МХ наслідків (тобто розвитку мітохондрійної дисфункції)» (ст. 248) є неповним, оскільки не можна виключити їхній вплив на утворення активних форм нітрогену, які є не менш токсичними, ніж активні форми кисню. Флуоресцентний барвник DCF-DA дозволяє детектувати в основному активні форми кисню (переважно пероксид водню) і не виявляє активні форми нітрогену. Тому про абсолютні біотолерантність каліксаренів можна говорити лише із пересторогою.

7. Дисертаційна робота Данилович Г.В. є достатньо різнопланово з використанням як різних експериментальних моделей, так і комп'ютерного моделювання. Враховуючи ці обставини, авторці роботи необхідно більш чітко сформулювати **основні положення, які виносяться на захист**.

8. Дисертантці бажано в подальшому більше уваги приділити публікаціям результатів у закордонних журналах з високим рейтингом, а також активніше пропагувати наукові здобутки за кордоном. Також необхідно намагатись активніше брати участь у міжнародних проектах, наприклад, УНТЦ (STCU), CRDF та в білатеральних проектах за участю України та іноземних держав.

9. В авторефераті сказано, що підсумки та аналіз отриманих результатів наведено в Розділі 4 «Узагальнення отриманих результатів дослідження», тоді як у Змісті дисертації Розділ 4 називається «ЗАКЛЮЧНИЙ РОЗДІЛ».

10. Автореферат перевантажений скороченнями, що утруднює читання його тексту.

**Висновок.** На основі вищевикладеного вважаю, що дисертаційна робота Данилович Г.В. «БІОСИНТЕЗ ТА РЕГУЛЯТОРНА РОЛЬ ОКСИДУ АЗОТУ В МІТОХОНДРІЯХ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА», є завершеним оригінальним науковим дослідженням, яке за актуальністю, новизною, важливістю, достовірністю, а також практичною цінністю одержаних наукових результатів відповідає вимогам пп. 9, 10, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою КМУ № 567 від 24.07.2013 р. зі змінами, внесеними згідно з Постановами КМУ № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р., № 567 від 27.07.2016 р., № 943 від 20.11.2019 р. та № 607 від 15.07.2020 р., Вимогам до оформлення дисертації, затверджених наказом МОН України від 12.01.2017 р. № 40, зареєстрованого у Міністерстві юстиції України 03.02.2017 р. за № 155/30023 щодо докторських дисертацій, а її авторка, Данилович Г.В., заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія.

Офіційний опонент,  
завідувач відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу  
Інституту біології клітини НАН України,  
доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України

Стойка Р.С.

Львів, 16 листопада 2021 р.

Підпис члена-кореспондента НАН України Стойки Р.С. засвідчую:

Вчений секретар Інституту біології клітини НАН України,

к.б.н.



Барська М.Л.