

Голові спеціалізованої вченої ради  
при Інституті біохімії  
ім. О.В. Палладіна НАН України  
доктору біологічних наук, професору,  
провідному науковому співробітнику  
відділу науково-технічної інформації  
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна  
НАН України  
Ользі МАТИШЕВСЬКІЙ

### **ВІДГУК**

офіційного опонента, доктора біологічних наук,  
професора по кафедрі хімії, керівника науково-дослідної лабораторії  
порівняльної біохімії і молекулярної біології, професора кафедри хімії та  
методики її навчання Тернопільський національний педагогічний університет  
імені Володимира ГНАТЮКА МОН України  
Оксани СТОЛЯР,  
на дисертаційну роботу Ольги ГУДКОВОЇ  
«Залучення амінооксидаз до розвитку патологічних станів нирки та  
легені»,  
подану на здобуття наукового ступеня  
доктора філософії з галузі знань 09 –  
Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія.

#### **1. Актуальність обраної теми**

Дисертаційна робота Ольги ГУДКОВОЇ присвячена вивченню ролі амінооксидаз вищих хребетних тварин у патологічних процесах. На наш час кількість публікацій, присвячених вивченню структури і функцій цих оксидоредуктаз, залучених до контролю рівнів таких біологічно активних молекул як моно-, ди- та поліаміни, та практичному застосуванню результатів досліджень досягла грандіозних масштабів. Зокрема, пошук у системі Google відповідно до специфіки досліджених у представленій роботі моделей дозволив отримати наступні результати: amine oxidases and kidney and lung diseases - приблизна кількість результатів 2 180 000 (0,50 с); monoamine oxidases and kidney and lung diseases - приблизна кількість результатів 569 000 (0,40 с); diamine oxidases and kidney and lung diseases - приблизна кількість результатів 265 000 (0,39 с). Водночас, незважаючи на 75-річну історію досліджень, розуміння патофізіологічного значення цієї групи ензимів вимагає подальших значних міждисциплінарних зусиль. Залишається багато суперечностей і незрозумілих моментів щодо метаболічного регулювання їх експресії, активності та фармакологічної корекції, селективної оцінки їх ролі у забезпеченні рівня структурних поліамінів, сигнальних моноамінів, особливостей функцій

внутрішньоклітинних та циркуляторних ензимів. Слід також зазначити, що представлена дисертаційна робота є логічним підсумком багаторічних досліджень з вивчення ролі високо реактивних сполук у патогенезі метаболічних, імунних та онкологічних захворювань, розпочатих під керівництвом проф. Миколи ДМИТРЕНКА та к.б.н. Сергія ШАНДРЕНКА й продовжених під науковим керівництвом проф. Людмили ДРОБОТ. Сказаним визначається актуальність теми дисертаційної роботи Ольги ГУДКОВОЇ, повністю присвяченої вивченню зв'язку між системними змінами у функціонуванні амінооксидаз й розвитком патологічних станів нирки та легені.

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

Представлена робота містить результати експериментальних досліджень, які було виконано протягом 2011-2022 рр. у відділах регуляції обміну речовин та сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України відповідно до плану науково-дослідних робіт Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, теми та номера держреєстрації наведені у Вступі дисертації. («Порівняльне дослідження біологічної дії ендogenous альдегідів як регуляторів метаболізму та чинників його порушень при патологічних станах різного генезу» (2010-2014рр., № державної реєстрації 0110U002700 «Фундаментальні дослідження»), «Роль амінооксидаз у розвитку карбонільно-оксидативного стресу за патологій різного генезу» (2015-2017 рр., № державної реєстрації 0115U003644 «фундаментальні дослідження»), «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (2012-2016 рр., № державної реєстрації 0112U2624), «Механізми ядерного та метаболічного репрограмування пухлинних клітин, асоційовані з прогресією онкологічних захворювань: внесок адаптерного протеїну Ruk/CIN85» (2020-2024 рр., № державної реєстрації 0120U002191)).

## **3. Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих у дисертації**

Отримані дисертанткою результати в повній мірі дають підстави зробити аргументовані висновки, оскільки всі експерименти *in vivo* та *in vitro* сплановано належним чином з використанням достатньої кількості тварин та повторів. Дисертантка разом з науковим керівником чітко окреслила мету та завдання дослідження. Слід зазначити, що мета і завдання роботи, положення наукової новизни і висновки дисертації є логічно взаємопов'язаними, відповідають змісту роботи і повністю відображають результати. Основні етапи виконання дисертаційного дослідження здійснені автором самостійно.

Представлена дисертація є оригінальною науковою працею, яка виконана на належному методичному та теоретичному рівнях. Робота має послідовну та логічну структуру і є комплексним та завершеним науковим дослідженням. Аргументований аналіз результатів власних досліджень свідчить про високий рівень наукової компетентності автора.

Таким чином, наукові положення, висновки і рекомендації, що

викладено у дисертаційній роботі Ольги ГУДКОВОЇ є повністю обґрунтованими.

**4. Достовірність основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, проведених наукових досліджень та одержаних результатів.**

Сформульовані Ольгою ГУДКОВОЮ основні наукові положення та висновки ґрунтуються на використанні адекватних щодо поставлених завдань методів як класичної, так і сучасної біохімії, клітинної та молекулярної біології: диференційного центрифугування, спектрометрії, флюорометрії, диференційної та ЕПР спектроскопії, імуноензимного, Вестерн-блот, гістологічного, морфометричного та статистичного аналізів, тощо. Експерименти на тваринах проводились із дотриманням положень Про захист тварин від жорстокого поводження" (№ 3747-IV від 21.02.2006), Методичних рекомендацій про використання тварин у біомедичних дослідженнях, із дотриманням етичних норм Директиви № 86/609/ЄС.

Це дозволило провести кваліфіковані вимірювання, які відповідають поставленим завданням, а коректно виконаний статистичний аналіз отриманих результатів дозволив оцінити їх та основні наукові положення й висновки досліджень дисертантки як достовірні.

Дослідження на тваринних моделях здійснювались із дотриманням біоетичних вимог, а на клітинних лініях - норм біологічної безпеки.

**5. Новизна основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, а також проведених наукових досліджень та одержаних результатів.**

Представлена робота є оригінальним дослідженням, що має прикладне значення в галузі експериментальної медицини. Завдяки вивченню змін в активності різних за функціональним призначенням та принципом дії представників амінооксидаз (всього чотири) за патологій нирки та легені на восьми експериментальних моделях *in vivo* та *in vitro*, отримані результати дозволили отримати уявлення на системному рівні стосовно участі амінооксидаз у розвитку досліджених патологічних процесів. Зокрема, у роботі були одержані нові дані стосовно позитивної кореляції між ступенем прогресування захворювання нирки, зумовленого рабдоміолізом, діабетом 1 типу та діабету, ускладненого рабдоміолізом, та рівнем активностей ди-, полі та семікарбозидчутливої амінооксидаз (відповідно DAO, PAO та SSAO) за умов моделювання цих патологічних станів у щурів. Вперше показано наявність регуляторного взаємозв'язку між функціонуванням амінооксидаз та вмістом вільного оксиду азоту. Завдяки проведеному аналізу, авторкою вперше доведено із застосуванням електронно-парамагнітного резонансу зміни у розподілі вільного та ферум-зв'язаного оксиду азоту після індукування рабдоміолізу у діабетичних тварин. Визначення активності лізилоксидази (LOX), маркера порушення структурно-функціонального стану позаклітинного матриксу, розширило доказову базу участі амінооксидаз у патологіях. Вперше експериментально із застосуванням диференційної

спектроскопії доведено механізм розпаду семікарбазиду за участі CYP450-залежних монооксидаз та продемонстровано корегувальний вплив цього агенту на морфологію тканини органу-мішені тварин на тлі розвитку захворювань. Піонерськими дослідженнями можна вважати такі, що проведені на моделях клітинних ліній карциноми легені Льюїс із down-регулюванням адаптерного протеїну Ruk/CIN85, що доводять безпосередню причетність амінооксидаз до контролю онкологічного процесу.

#### **6. *Практичне значення одержаних результатів***

Практичне значення роботи полягає у вдосконаленні принципів корекції патологічних станів нирки та легені за участі інгібітора амінооксидаз семікарбазиду у клітинах та визначенні нижнього порогу його токсичності, що створює основу для безпечного використання цього агента у клініці. Важливо, що роботи такої скерованості в науковій літературі нами не виявлені. Вперше встановлено відповідність між змінами активностей мідь-вмісних амінооксидаз у мурчаків та щурів з експериментальною патологією та ступенем прогресування захворювання, що може бути використано як біохімічний маркер розвитку патології.

#### **7. *Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях.***

За результатами дослідження опубліковано 9 статей у фахових наукових виданнях України, які індексуються у базах даних Scopus, та 18 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових Всеукраїнських та Міжнародних конференцій. Основні наукові положення дисертаційного дослідження повністю, на професійному рівні викладені у представлених публікаціях та обговорені на наукових зібраннях.

#### **8. *Структура дисертації***

Робота містить вступ, чотири розділи («Огляд літератури», «Матеріали і методи», «Результати експериментальних досліджень», «Аналіз та узагальнення результатів»), висновки, список використаних джерел. Дисертацію проілюстровано 35 рисунками і 17 таблицями. Співвідношення між обсягом складових дисертаційної роботи відповідає рекомендованому. Повний обсяг дисертації становить 199 сторінок.

У вступі обґрунтовано актуальність дисертаційного дослідження, сформульовано мету, завдання, вказані методи дослідження. Відображено наукову новизну, теоретичне та практичне значення роботи. Наведені дані про особистий внесок здобувача, апробацію, впровадження результатів дослідження в навчально-науковий процес освітніх установ, публікації. Бажано було б використати більше посилань на джерела літератури в аргументації.

Огляд літератури стосується аналізу наявних даних за темою дослідження. Автор робить висновок про обмеженість даних з точки зору відсутності комплексного дослідження функціонування амінооксидаз за патологічних станів нирки та легені у ссавців, так само як і потенційного ефекту семікарбазиду на прояви захворювань. Загалом, Огляд написаний

творчо й охоплює всі сучасні теоретичні уявлення, що використовуються на наш час як підґрунтя для оцінки ролі каталітичного окисного дезамінування біогенних амінів у патологічних процесах, що забезпечило мотивацію подальшого дослідження різноманіття амінооксидаз, обрання коректних моделей та пошуку потенційних сполук для моделювання активності ензимів. Бажано було б завершити Огляд узагальнюючим абзацом.

У розділі «Матеріали та методи дослідження» висвітлено методику проведення дослідів *in vivo*, *in vitro* та *in cellulo*, отримання тканинних та клітинних зразків для проведення запланованих досліджень, весь спектр спектроскопічного аналізу, методи статистичної обробки результатів дослідження. Особливої уваги заслуговує детальний опис розроблених методів визначення активностей амінооксидаз, що є, безумовно, оригінальним внеском у дослідження цих ензимів. Методична частина також містить модифікацію вже існуючих методів (визначення активностей ензимів, вмісту метаболітів та протеїну в біологічних зразках) для вирішення конкретних завдань дослідження.

У третьому розділі представлено результати експериментальних досліджень *in vivo* (модель рабдоміолізу, діабету 1 типу, діабету, ускладненого рабдоміолізом та фіброзу легені у щурів-самців лінії Wistar, бронхіальної астми у мурчаків-самців), *in vitro* (метаболічне перетворення семікарбазиду мікросомною фракцією щурів) та *in cellulo* (модель високоінвазивних клітин карциноми легені Льюїс миші з різним рівнем експресії адаптерного протеїну/Ruk/CIN85). Дизайн експериментів є продуманим з використанням кількості тварин, необхідної для отримання статистично достовірних результатів.

У розділі «Аналіз та узагальнення отриманих результатів» дисертантка робить висновок, що всі обрані для вивчення ензими родини амінооксидаз є важливими складовими патологічних процесів, причому у кожній дослідженій моделі спостерігається їх активування, що супроводжується посиленням продукування високо реактивних продуктів, зокрема оксиду азоту, нітрозильованих сполук гемоглобіну та нітротирозину протеїнів. Дисертантка підкреслює важливе доказове значення досліджень на ракових клітинах з down-регулюванням адаптерного протеїну Ruk/CIN85 щодо залучення амінооксидаз до контролю онкологічного процесу. Як підкреслює дисертантка, важливою складовою доказової бази стало також використання семікарбазиду у малотоксичній концентрації, що дозволило підтвердити участь купрум-вмісних амінооксидаз у розвитку патології легені.

На основі проведених досліджень дисертантка формулює шість висновків констатуючого характеру, які відповідають поставленим завданням та повною мірою відображують результати роботи. Позаяк, бажано було б сформулювати також висновок практичного спрямування, який обґрунтовує рекомендації щодо використання отриманих результатів у діагностиці та корекції патологічних станів.

Загалом, на підставі отриманих результатів складається враження, що, незважаючи на різні функціональні активності та локалізації у тканинах полі-

, ди-, Cu-вмісної семікарбазидзалежної та лізил-амінооксидаз, з яких SSAOs, DAO та LOX інгібуються семікарбазидом, за паталогічних станів спостерігається їх уніфікована реакція - активування в динаміці патології, що за часом вказує як на активацію експресії відповідних генів, так і контроль на рівні їх активності. Можна вважати, що експерименти з раковими клітинами підтверджують існування зазначеного регуляторного зв'язку. Позаяк, обмежена інформація в літературі щодо цього питання, на нашу думку, має стимулювати подальші дослідження у цьому напрямку. Рівень викладення та аналізу матеріалу вказує на належний рівень фахової підготовки дисертантки та системне мислення. Робота написана філологічно та науково грамотно. Особливої уваги заслуговує низка авторського ілюстративного матеріалу, що візуалізує описані в тексті паталогічні процеси та полегшує сприйняття їх підґрунтя з точки зору залучення амінооксидаз.

#### **9. Недоліки дисертації щодо їх змісту та оформлення.**

Принципових недоліків у роботі мною не виявлено, але є низка питань дискусійного характеру та зауважень до термінології і подання цифрового матеріалу.

1. Авторка зазначає (с. 4), що за паталогічних умов рівні біогенних амінів та поліамінів в організмі людини зростають. У роботі ми не знайшли відповіді на питання щодо ефективності амінооксидаз у їх видаленні та доцільності такої активності з огляду на їх функції у контексті і дискусії у публікації «*Polyamines: Toxic or Panacea?*» (Zahedi et al., 2022, <https://doi.org/10.3390/medsci10030038>).
2. Термін «розчинна» амінооксидаза щодо ензиму плазми крові, хоча і практикується у літературі, бажано замінити терміном «циркулююча».
3. С. 46 «DAO - єдиний ензим здатний контролювати ендogenous рівні гістаміну»... Діамінооксидаза насправді не є єдиним ензимом, що забезпечує окисне дезамінування гістаміну, як стверджує авторка, хоча і основним поза тканинами головного мозку. Крім того, цей ензим працює і з іншими субстратами (відповідно до назви) (Haas et al., 2008. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2007>; Maršavelski et al., 2022, <https://doi.org/10.3390/ijms23031910>).
4. С. 25 «Біогенні аміни як внутрішньоклітинні посередники», а позаклітинні?
5. У експериментах отримано досить високі значення активностей амінооксидаз (порядку сотень нмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$ /хв/мг протеїну). Оскільки у літературі повідомляється про їх на порядок-два меншу активність, слід аргументувати відмінності.
6. Стосовно використаних методів, у їх описі не вказано, що активність супероксиддисмутази у цитоплазматичних екстрактах відповідає СОД1 (тобто цитоплазматична Cu,Zn-SOD) +СОД2 (Mn-SOD мітохондрій).
7. Робота перевантажена скороченнями. Всього налічується 69 скорочень, з яких, на нашу думку, можна було уникнути невживаних у біохімії термінів, на кшталт, АМ – альвеолярні мішечки, АХ – альвеолярні ходи,

БА - бронхіальна астма, БАЛ - бронхо-альвеолярний лаваж, ЕТЛ - електронно-транспортний ланцюг (вжито лише один раз в тексті), ГНН - гостра ниркова недостатність, ДХН - діабетична хвороба нирок.

8. У визначенні практичного значення роботи (с. 4) і далі по тексту вказуються показники семікарбазиду: (SC), у концентраціях 0,005-0,05% , але це масові частки, і незрозуміло, стосовно чого вони визначені.
9. У таблицях Розділу 3 не завжди відзначено вірогідні від контролю відмінності ( $0,85 \pm 0,22$  у табл. 3.1) та не уніфіковано кількість значущих цифр у показниках

#### **10. Висновок**

Дисертаційна робота Ольги ГУДКОВОЇ «Залучення амінооксидаз до патологічних станів нирки та легені» за актуальністю, науково-теоретичним рівнем, новизною постановки та розв'язанням проблем, практичним значенням відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12 січня 2022 р., № 44, а здобувач заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія.

Професор кафедри хімії  
та методики її навчання  
Тернопільського національного  
педагогічного університету  
імені Володимира ГНАТЮКА,  
професор доктор біологічних наук

Оксана СТОЛЯР