

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 кафедри біохімії,
професора кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного
університету ім. Василя СТЕФАНІКА МОН України

Володимира ЛУЩАКА,

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.

Актуальність обраної теми. На сьогодні метаболізм сполук з високою реакційною здатністю, активних форм кисню й азоту (АФК, АФА) та реактивних карбонільних сполук (РКС), в живих організмах розглядається чи не головним чинником, який визначає як підтримання гомеостазу за фізіологічного стану, так і ініціювання патології через індукування оксидативного, нітрозативного та карбонільного стресів. Тому ділянки обміну речовин, а саме, реакції окисного дезамінування біогенних амінів та поліамінів за участі амінооксидаз, на яких одночасно утворюються два класи зазначених метаболітів, пероксид водню та альдегіди, безумовно, заслуговують особливої уваги при дослідженні патогенезу низки захворювань.

Цей напрямок досліджень важливий ще й з іншої точки зору, адже амінооксидази підтримують рівні власних субстратів, сполук з високою біологічною активністю, які залучені до контролю важливих фізіологічних процесів як на клітинному рівні (ріст, диференціювання, проліферування), так і на рівні цілого організму, зокрема регулювання діяльності нервової, імунної, травної систем та ін. Відомо, що будь-яка патологія супроводжується

багаторазовим підвищенням в тканинах та органах ссавців рівнів біогенних амінів (гістаміну, адреналіну, норадреналіну, дофаміну, метиламіну тощо) та поліамінів (путресцину, спермідину, сперміну). Відтак, зміни у функціонуванні обраних Ольгою ГУДКОВОЮ для дисертаційного дослідження представників класу оксидоредуктаз, таких як семікарбазидчутлива амінооксидаза, поліамінооксидаза та діамінооксидаза, можуть визначати розвиток специфічних патофізіологічних процесів за умов прогресування низки захворювань. Окреме місце в родині амінооксидаз займає лізілоксидаза, за участі якої відбувається дозрівання протеїнів позаклітинного матриксу, колагену та еластину, внаслідок чого формується функціонально повноцінна сполучна тканина. Варто зазначити, що порушення цих процесів призводить до розвитку таких патологічних станів як фіброз легені та нирки, а також є складовою механізмів прогресування онкологічних захворювань.

З огляду на сказане, роль всіх чотирьох ензимів, які були досліджені в рамках представленої дисертаційної роботи, важко переоцінити у патогенезі таких захворювань як цукровий діабет, бронхіальна астма, злоякісні новоутворення, а також їх ускладнень. Враховуючи, що останніми десятиліттями динаміка захворюваності на ці патології в світі набула масштабу пандемії, а наявні терапевтичні підходи до їх лікування не завжди ефективні, актуальність обраної теми дослідження Ольгою ГУДКОВОЮ не викликає сумніву.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Представлена дисертаційна робота Ольги ГУДКОВОЇ є тривалим експериментальним дослідженням, яке проводилось в рамках бюджетних НДР Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна в період 2011-2022 рр.: «Порівняльне дослідження біологічної дії ендогенних альдегідів як регуляторів метаболізму та чинників його порушень при патологічних станах різного генезу» (2010-2014 рр., номер державної реєстрації 0110U002700 «Фундаментальні дослідження»); «Роль амінооксидаз у розвитку карбонільно-оксидативного стресу за патологій різного генезу» (2015-2017 рр., номер державної реєстрації 0115U003644 «фундаментальні дослідження»); «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (2012-2016

рр., номер державної реєстрації 0112U2624); «Механізми ядерного та метаболічного репрограмування пухлинних клітин, асоційовані з прогресією онкологічних захворювань: внесок адаптерного протеїну Ruk/CIN85» (2020-2024 рр., номер державної реєстрації 0120U002191).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертантка разом з науковою керівничкою точно і чітко сформулювала мету, яка полягала в дослідженні біологічної ролі чотирьох представників родини амінооксидаз у розвитку патологічних станів нирки та легені, а також ефекту інгібітора мідь-вмісних амінооксидаз, семікарбазиду, на прояви захворювань, та відповідні для її досягнення завдання. Робота виконана здобувачкою протягом тривалого часу, а тому містить великий обсяг результатів експериментальних досліджень, які проводились на моделях *in vivo* з використанням необхідної для отримання статистично достовірних даних кількості тварин. Поставлені завдання роботи реалізовані в повному обсязі. На підставі аналізу отриманих результатів досліджень були сформульовані обґрунтовані висновки та наукові положення. У тексті дисертації відсутнє порушення вимог академічної доброчесності.

Структура дисертації. Дисертація Ольги ГУДКОВОЇ загальним обсягом 195 сторінок комп'ютерного набору є завершеною науковою працею, яка містить розділи відповідно до вимог: анотацію українською та англійською мовами, вступ, огляд літератури, розділ «Матеріали та методи досліджень», шість розділів власних досліджень, аналіз і узагальнення отриманих результатів та висновки. Список використаних джерел містить 196 найменувань, з яких 18 кирилицею. Текст супроводжується 35 рисунками та 17 таблицями.

Анотація стисло висвітлює весь зміст дисертації від формулювання актуальності та мети до викладення основних результатів дослідження, їх новизни та рекомендацій щодо практичного використання.

В розділі «Огляд літератури» висвітлені сучасні відомості про особливості метаболізму реакційно здатних сполук всіх трьох класів, АФК, АФА та РКС, за умов норми та патології, структуру та функції досліджених амінооксидаз та їх субстратів, біогенних амінів та поліамінів. Вражає

плейотропність біологічних ефектів розчинної та мембранозв'язаної форм семікарбазидчутливої амінооксидази, діамінооксидази/гістамінази, поліамінооксидази та лізілоксидази. Важливо зазначити ретельність опису патогенезу досліджених патологічних станів: рабдоміолізу, цукрового діабету, бронхіальної астми та онкологічних захворювань, з акцентом на роль реактивних метаболітів в цих процесах. Окремо приділено також увагу механізмові інгібувальної дії семікарбазиду на ензиматичну активність трьох мідь-вмісних амінооксидаз, що можна розглядати як перекидний місток між теоретичною та експериментальною частинами роботи.

Методична частина містить ґрунтовний опис всіх застосованих у роботі методів класичної біохімії: моделювання патологічних станів у експериментальних тварин (гліцерол-індукованого рабдоміолізу, стрептозотоцин-індукованого діабету та блеоміцин-індукованого фіброзу легені щурів, овальбумін-індукованої бронхіальної астми у мурчаків), диференційне центрифугування, спектрофотометрія та флуориметрія, імуноензимний аналіз, біофізики (електронна парамагнітно-резонансна спектрометрія), молекулярної клітинної біології (культивування еукаріотичних клітин, Вестерн-блот аналіз) та статистичного аналізу. Особливої уваги заслуговує той факт, що для визначення активності амінооксидаз використаний метод, який розробила дисертантка в співпраці з колегами, а для визначення концентрації протеїну у біологічних зразках застосовано класичний метод, оригінально модифікований у відділі. Для різнобічного дослідження патологічних станів застосоване також визначення активності антиоксидантних ензимів.

Розділ дисертації, який містить результати досліджень, можна умовно поділити на три частини. Перша з них присвячена дослідженню участі амінооксидаз у розвитку патології нирки, яка є наслідком двох системних захворювань, рабдоміолізу та цукрового діабету 1 типу. На моделі рабдоміолізу показано, що активність семікарбазидчутливої амінооксидази, діамінооксидази, поліамінооксидази в тканинах органів-мішеней щурів, а саме в нирці та тимусі, зростають. Зміни активності антиоксидантних ензимів, каталази та супероксиддисмутази, в цих тканинах вказують на розвиток оксидативного стресу, як одного з можливих чинників деструкції ниркової

тканини. Аналіз цих даних дав підставу дисертантці обрати активність семікарбазидчутливої амінооксидази як можливого маркера дослідження ниркової патології за цукрового діабету. На цій моделі з застосуванням механістичного підходу, ускладнення діабету рабдоміолізом для посилення потужності оксидативного стресу, продемонстровано, що найбільший внесок у прогресування патологічних змін в організмі тварин і, зокрема, нирки, належить чинникам нітрозативного стресу, активним формам азоту, рівень яких позитивно корелював із рівнем активності семікарбазидчутливої амінооксидази не тільки в нирці, але і в інших органах та тканинах-мішенях, крові та печінці.

Неочікуваним був результат при комбінуванні діабету і рабдоміолізу, який виявився у зниженні рівнів низки біохімічних показників, зокрема активності семікарбазидчутливої амінооксидази, ймовірно, за рахунок зв'язування активних форм азоту в тканинах щурів. Це дало основу для ідеї стосовно застосування методичних підходів, які дозволяють суттєво пригнічувати активність амінооксидаз під час прогресування патології. Таким підходом було обрано застосування семікарбазиду – незворотного інгібітора мідь-вмісних амінооксидаз. Дослідженню механізму його біотрансформації в організмі тварин присвячена наступна частина експериментального розділу. На цьому етапі досліджена локалізація, ідентифіковані продукти розкладання даної сполуки, причини та межі її токсичної дії.

Третя частина цього розділу дисертації присвячена вивченню причетності амінооксидаз до розвитку патології легені, яка є органом-мішенню алергічної бронхіальної астми, фіброзу легені та карциноми легені Льюїс. Поставлене завдання на перших двох моделях виконано із застосуванням семікарбазиду у визначеній на попередньому етапі нетоксичній дозі, а друге – з використанням моделі субліній високоінвазивних клітин карциноми легені Льюїс, контрольної та зі зниженим ступенем агресивності шляхом нокдауну адаптерного протеїну Ruk/CIN85. На моделях бронхіальної астми та фіброзу легені гістологічно підтверджено, що застосування семікарбазиду в концентрації 0,005-0,05 % ефективно пригнічує розвиток ознак патології. На моделі клітин LLC продемонстровано, що зниження рівня експресії протеїну Ruk/CIN85

позитивно корелює з рівнем активності всіх досліджених амінооксидаз, які контролюють проліферативний потенціал, здатність уникати імунної відповіді організму, стан позаклітинного матриксу як показник ступеня метастазування.

Новизна основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, а також проведених наукових досліджень та отриманих результатів. В представленій роботі є низка наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, які мають характер новизни та відображають особистий внесок дисертантки. До таких можна віднести наступні:

- прогресування досліджених в ході роботи захворювань нирки та легені супроводжується зростанням активності амінооксидаз, що позитивно корелює з важкістю перебігу патологій внаслідок генерування цими ензимами додаткових рівнів чинників оксидативно/карбонільного стресу;

- амінооксидази є чутливими до вільного оксиду азоту в організмі, а використання його пасток за умов патології, що супроводжується нітрозативним стресом, можна використати як терапевтичний підхід;

- застосування семікарбазиду в концентрації 0,005-0,05% ефективно стримує розвиток проявів легеневої патології внаслідок пригнічення активності мідь-вмісних амінооксидаз, що також може бути складовою комплексного лікування системних захворювань;

- семікарбазид в організмі ссавців зазнає перетворення за участі родини цитохромів P-450 печінки, межею чутливості яких до цієї сполуки є концентрація 1,5 мМ.

Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях. Результати експериментальних досліджень, які лягли в основу дисертаційної роботи Ольги ГУДКОВОЇ, повністю, на високому професійному рівні висвітлені в 9 наукових публікаціях у фахових виданнях, що проіндексовані в наукометричній базі SCOPUS та відповідають вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії»,

затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 4 від 12 січня 2022 р., 1 статті з додаткового переліку наукових праць та 18 тезах доповідей, представлених на міжнародних та вітчизняних конференціях.

Дискусійні питання, побажання та зауваження:

1. В таблиці 3.1 стор. 101 та 3.4. стор. 105 відсутні цифри в декількох комірках. З чим це пов'язано?
2. Чим можна пояснити відсутність характерних різноскерованих змін в рівнях пероксидазної та каталазної активності каталази в нирці за рабдоміолізу на 3-й та 6-й дні? Адже саме ця особливість каталази як біфункційного ензиму описана в тексті (стор.103, посилання141)?
3. Якими міркуваннями зумовлений вибір тимусу для дослідження патогенезу рабдоміолізу?
4. Чи можна розглядати підвищення активності антиоксидантних ензимів в тканинах експериментальних тварин з розвинутою патологією (це стосується всіх моделей) як позитивний феномен?
5. Наявність регуляторного взаємозв'язку між обміном оксиду азоту та функціонуванням семікарбазидчутливої амінооксидази через амоній залишається достатньо дискусійною.
6. Чи дає можливість ЕПР-спектроскопія виокремити АФА та АФК?
7. Який з продуктів реакції окисного дезамінування амінів за участі амінооксидаз відіграє провідну роль у патологічних процесах у нирці та легені?
8. Як можна пояснити відсутність змін в обміні АФА у астматичних тварин, які отримували корегувальний засіб?
9. Які типи колагену присутні в легеневій тканині та шкірі? Які типи цих протеїнів змінюються за умов розвитку астми? Чи коректно судити про ступінь зшивання колагену в легені астматичних тварин на підставі оцінювання цього показника в шкірі?
10. Для оцінювання ступеня ураження нирки бажано було провести гістологічний аналіз.
11. В роботі відсутні дані щодо визначення рівнів поліамінів та біогенних амінів в тканинах тварин.

- 12.Рівні активності яких саме амінооксидаз використовуються як маркери в клініці?
- 13.Які саме представники родини цитохромів P450 можуть бути задіяні у процесах біотрансформації семікарбазиду?
- 14.Семікарбазид є незворотним інгібітором. Які переваги та недоліки його використання?
- 15.Чи робились спроби оцінити диференційну роль окремих амінооксидаз у розвитку досліджуваних патологічних станів з використанням селективних інгібіторів?
- 16.В тексті мають місце описки та технічні помилки, а також кальки з іноземних мов.

Проте, запитання та зауваження, які виникли під час ознайомлення з дисертацією О. ГУДКОВОЇ мають лише дискусійне значення і ніякою мірою не знижують позитивної оцінки дисертації в цілому, а також викладених дисертантом основних наукових положень та висновків.

Висновок

Дисертаційна робота Ольги ГУДКОВОЇ «Залучення амінооксидаз до патологічних станів нирки та легені» за актуальністю, науково-теоретичним рівнем, новизною постановки та розв'язанням проблем і 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 здобувачка заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія.

Професор

Володимир ЛУЩАК