

ВІДЗИВ

офіційного опонента

на дисертаційну роботу **Манька Богдана Олексійовича**
«АДАПТАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ МІТОХОНДРІЙ АЦИНАРНИХ КЛІТИН
ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ТА ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ»

представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
за спеціальністю 03.00.04 - Біохімія

Актуальність теми дисертаційної роботи

Захворювання печінки і підшлункової залози значною мірою зумовлені порушенням харчування та ожирінням. Рівень захворюваності на гострий панкреатит та цироз печінки постійно зростає. Причиною є збільшення вживання алкоголю, а також великої кількості жирів і легкозасвоюваних вуглеводів. Збільшення вмісту жирової тканини у підшлунковій залозі може бути причиною панкреатитів, діабету II типу, раку підшлункової залози тощо. Тяжкі хвороби підшлункової залози та печінки, пов'язані із вживанням алкоголю та ожирінням, призводять до високої смертності. Ці фактори також мають наслідком розвиток неалкогольної хвороби печінки та жирового переродження підшлункової залози.

Існує думка, що недостатня адаптація мітохондрій до вищезазначених негативних впливів та їхнє пошкодження є основними чинниками розвитку патологічних процесів. Вільні жирні кислоти та їхні естери пригнічують синтез АТР та життєздатність панкреатитів. Втім, не досліджений вплив як високожирової дієти, так і з високим вмістом цукрів на функціонування мітохондрій ацинусів.

Окисне фосфорилування в мітохондріях є важливим для функціонування гепатоцитів. Мітохондрійні хвороби призводять до зниження окиснення ліпідів, фіброзу та стеатозу печінки. Мітохондрії, як припускають, залучені в патогенезі алкогольної та неалкогольної хвороб печінки. Тому дослідження адаптаційної здатності мітохондрій печінки може мати цінне діагностичне значення.

Роль амінокислот і інших субстратів окиснення у функціонуванні екзокринної частини підшлункової залози та розвитку її захворювань є актуальним питанням сучасної біохімії і медичної біології. Для забезпечення енергетичних потреб ацинусів, синтезу і секреції ними травних ензимів необхідний інтенсивний транспорт та метаболізм амінокислот в клітинах. Дефекти протеїнів, які забезпечують ці процеси, спричиняють гострий панкреатит. Ще однією причиною цього захворювання є надлишкове надходження аргініну до організму. З одного боку, у пацієнтів з гострим панкреатитом спостерігаються суттєві зміни амінокислотного складу крові, а з іншого – пропонується терапія цього захворювання шляхом додаткового введення в раціон окремих амінокислот.

Рівень базального дихання мітохондрій в клітинах відображає лише частково їхню здатність до окисного фосфорилування. Адаптаційні можливості мітохондрій, які співвідносяться з максимальною активністю, оцінюють за допомогою протонофорів, реєструючи в експерименті роз'єднане дихання. Максимальне роз'єднане дихання корелює зі станом клітини. Іншим важливим показником адаптаційної здатності мітохондрій є стабільність роз'єданого дихання, яке характеризує спроможність підтримувати його високу швидкість тривалий час і за високих концентрацій протонофора.

Тому мета дисертаційної роботи Манька Богдана Олексійовича, а саме – охарактеризувати адаптаційну здатність ацинарних клітин підшлункової залози та печінки за умов різного субстратного забезпечення, дії гормонів, алкоголю і харчових факторів, є сучасною і актуальною.

Зв'язок теми дисертації з плановими науковими дослідженнями та науковими програмами

Дисертаційну роботу виконано на базі кафедри фізіології людини і тварин та Центру колективного користування клітинної біології та біоенергетики Львівського національного університету імені Івана Франка в

рамках держбюджетних тем «Ca²⁺-транспортувальні системи та регуляції клітинного дихання екзокринних залоз у нормі і за дії стресорних чинників» (2015–2017 рр., № держреєстрації 0115U003246), «Адаптаційний потенціал мітохондрій секреторних клітин підшлункової залози і печінки у нормі та за розвитку патології» (2018–2020 рр., № держреєстрації 0118U003604), «Функціональна оцінка мітохондрій: пайплайн для виявлення механізмів передпатологічних станів травних залоз» (2023–2025 рр., № держреєстрації 0123U101951), проєкту у межах робочого часу викладачів «Транскрипційна і функціональна адаптація мітохондрій підшлункової залози та печінки до дієтарних чинників» (2021–2023 рр., № держреєстрації 0121U110302), проєкту «Механізми реалізації окисного потенціалу мітохондрій клітин підшлункової залози, печінки та лімфоми NK-Ly» (2015–2016 рр), фінансованого компанією «Material Phases Data System» і проєкту «State of rat pancreatic mitochondria in situ at experimental acute pancreatitis» (2013–2014 рр), фінансованого Західно-Українським центром біомедичних досліджень (West-Ukrainian BioMedical Research Center – WUBMRC).

Загальні відомості про роботу

Структура і написання дисертації відповідають вимогам ДАК МОН України. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення і критичного аналізу результатів, висновків та списку використаних літературних джерел (356 найменувань). Дисертацію викладено на 252 сторінках друкованого тексту, проілюстровано 72 рисунками і 22 таблицями. Список літератури містить значну кількість сучасних посилань.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті

Результати досліджень, які викладено в дисертації Манька Богдана Олексійовича, опубліковані у відкритому друці у вигляді 48 публікацій,

серед них 16 статей – у фахових виданнях з біологічних наук (3 - у закордонних та 13 – у вітчизняних виданнях). З них 3 статті у виданнях, віднесених до Q2, та 7 – до Q4; 3 патенти України на корисну модель, 29 тез доповідей у матеріалах конференцій, з'їздів, конгресів. Сумарний імпакт-фактор публікацій за темою дисертації – 8,8. Автореферат відображає основний зміст дисертації.

Характеристика змісту роботи

Рукопис оформлено згідно існуючих вимог за класичним зразком. У вступній частині дисертант зупинився на актуальності обраної теми, акцентувавши увагу на проблемах, пов'язаних із роллю амінокислот у функціонуванні екзокринної частини підшлункової залози та печінки, а також розумінням механізмів адаптації мітохондрій цих тканин до високих навантажень, пов'язаних з алкоголізмом та ожирінням. Грамотно сформульовані мета та задачі роботи, наголошується на науковій новизні та практичному значенні одержаних результатів. У розділі, присвяченому огляду літератури, автор зосередився на особливостях біоенергетики гепатоцитів та участі мітохондрій у патогенезі алкогольної хвороби печінки. Аналізуються біоенергетичні процеси в ацинарних клітинах підшлункової залози. Увага приділена методології дослідження дихання ізольованих мітохондрій і клітин.

В «Матеріалах та методах досліджень» достатньо повно описуються методики, використані для досягнення поставлених задач. Зокрема розглянуті використані в роботі біохімічні, фізико-хімічні та статистичні методи дослідження. Також акцентується увага на окремих математичних підходах, зокрема створенні програмних алгоритмів та морфометрії клітин.

Послідуючі розділи присвячено результатам експериментальних досліджень у відповідності із метою і основними завданнями дисертаційної роботи. Доречними є вступні абзаци та підсумки, відповідно, перед і в кінці кожного розділу, які дозволяють систематизувати одержані результати та

обґрунтувати доцільність послідууючої експериментальної роботи, а також заключний розділ, де наводяться узагальнення одержаних результатів і їх критичний аналіз із використанням даних літератури. Закінчують рукопис висновки і список використаних джерел.

Наукова новизна дослідження

Здобувачем автоматизовано процес аналізу записів споживання кисню за допомогою електрода Кларка. Було створене програмне рішення з використанням мови програмування Python, яке дає змогу швидко і точно аналізувати записи дихання ізольованих клітин і мітохондрій. Для тестування алгоритмів було обрано велику кількість записів дихання, для яких здійснено два паралельних вимірювання. Ці дані були також опрацьовані чотирма експертами. Човниковий алгоритм продемонстрував перевагу над усіма експертами й алгоритмами. Також для сегментації гепатоцитів та автоматичного визначення інтенсивності їх флуоресценції було написано макроси у програмі ImageJ.

Дисертантом було охарактеризовано адаптаційну відповідь мітохондрій ізольованих панкреатичних ацинусів на деполяризацію мітохондрійної мембрани протонофором в залежності від наявності різних субстратів у середовищі. Встановлено, що швидкість базального дихання не залежала від субстрату окиснення. Водночас функціональна відповідь мітохондрій ацинарних клітин на деполяризацію залежить від наявності та типу субстрату окиснення. Зокрема, глюкоза, піруват та глютамін підтримують вищу швидкість дихання при зростанні концентрації протонофора FCCP у порівнянні з експериментами без субстратів. Швидкість базального дихання практично не змінювалась після інкубації з субстратами циклу Кребса (малатом, ізоцитратом, сукцинатом та α -кетоглутаратом). Сукцинат та α -кетоглутарат статистично вірогідно не підвищували роз'єднане дихання. Їхні метилові естери монометилсукцинат та диметил- α -кетоглутарат значно підвищували споживання кисню за дії протонофору. Для

характеристики адаптаційної здатності мітохондрій панкреатичних ацинусів дисертант визначав максимальну швидкість роз'єданого дихання та оптимальну концентрацію протонофора. Найвища адаптаційна здатність мітохондрій проявилась за наявності в середовищі комбінації глюкози, пірувату та глютаміну. Зміна субстратів окиснення суттєво впливала на мітохондрійний електричний потенціал. Зокрема додавання пірувату або пірувату та глютаміну до середовища з глюкозою знижувало падіння мітохондрійного мембранного потенціалу. Водночас заміна глюкози на монометилсукцинат прискорювала деполяризацію. Доведено, що оптимальна комбінація субстратів (глюкоза, глютамін, піруват) покращувала адаптаційну здатність мітохондрій та знижувала протонофор-індуковану деполяризацію.

В дисертаційній роботі було досліджено особливості адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози за стимуляції ацетилхоліном, холецистокініном та інсуліном – сполуками, які регулюють секреторну функцію ацинарних клітин. Богданом Олексійовичем виявлено, що ацетилхолін, холецистокінін та інсулін стимулюють окисні шляхи в ацинарних клітинах, що проявляється у підвищенні швидкості базального та максимального дихання, а не його стабільності. Причому за впливу ацетилхоліну та холецистокініну ключовою є інтенсифікація окиснення пірувату, а інсулін посилює катаболізм глюкози.

Автором доведено, що загальноприйнята методика визначення максимального роз'єданого дихання є недостатньо чутливою для виявлення мітохондрійних та клітинних пошкоджень. Запропонована в роботі стабільність роз'єданого дихання за високих доз протонофорів є більш чутливим параметром.

В дисертаційній роботі встановлено, що у середовищі з глюкозою, незалежно від стимуляції ацетилхоліном чи холецистокініном, іони амонію знижували як базальне, так і роз'єдане дихання. Іони амонію також зменшували стабільність роз'єданого дихання. Тому поясненням зниження

швидкості роз'єданого дихання за присутності глютаміну може бути продукція аміаку глютаміназою.

Показано, що за короткочасного впливу холецистокініну і етанолу *in vivo* відбувається зниження швидкості дихання ацинарних клітин та індукція блебінгу. Поряд з цим, недостатнє забезпечення субстратами дихання *in vitro* робить ацинарні клітини вразливими до некротичних процесів за дії етанолу у комбінації з холецистокініном. Піруват і глютамін у цьому разі чинять протекторний вплив.

Доведено, що мітохондрії ацинарних клітин підшлункової залози здатні окиснювати глютамін, глютамат, аланін, лізин та аспартат, але не аспарагін, гістидин та аргінін. До того ж, у відносно високих концентраціях лізин, аргінін і глютамін викликають некроз панкреатичних ацинусів.

Встановлено, що введення пірувату натрію щурам з аргінін-індукованим гострим панкреатитом коригує рівень амінокислот у плазмі крові. Зокрема рівень багатьох замінних і незамінних амінокислот був нормалізований. Втім, гістологічні дослідження не свідчили на користь позитивного впливу пірувату натрію в цій експериментальній моделі.

В дисертації продемонстровано, що спосіб ізолювання гепатоцитів *in situ* дає змогу отримати клітини з вищою адаптаційною здатністю мітохондрій, ніж у випадку перфузії *in vitro*. До того ж, підвищення адаптаційної здатності мітохондрій можна досягти за умови використання як субстрати окиснення пірувату і монометилсукцинату.

При дослідженні впливу етанолу на досліджувані показники доведено, що *in vitro* він незначно стимулює базальне та роз'єдане дихання гепатоцитів. Водночас, в дослідях *in vivo* введення алкоголю щурам на фоні високожирової дієти спричинює інтенсифікацію мітохондрійного дихання гепатоцитів, але не впливає на мітохондрійне дихання ацинарних клітин підшлункової залози, а також пригнічує їхню секреторну функцію.

Дисертантом експериментально доведено, що активація мітохондрійної пори перехідної провідності Ca^{2+} призводить до пригнічення

окисного фосфорилювання та швидкості максимального роз'єданого дихання на моделі пермеабілізованих гепатоцитів. Втім, інгібітор пори перехідної провідності циклоспорин А не впливає на стимульоване етанолом дихання гепатоцитів.

Таким чином, Манько Б.О. вперше показано, що мітохондрії ацинарних клітин підшлункової залози та гепатоцитів здатні адаптуватись до фізіологічних та патологічних стимулів шляхом зміни окисної здатності. Доведено, що визначення стабільності роз'єданого дихання є не менш важливим показником адаптаційної здатності мітохондрій, ніж максимальна швидкість роз'єданого дихання.

Практичне значення одержаних результатів

В дисертаційній роботі запропоновано спосіб покращення енергетичного забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози із застосуванням амінокислот і пірувату. Манько Б.О. отримано нові експериментальні дані, які дають підстави застосовувати вибрані субстрати окиснення та амінокислоти, зокрема піруват, аланін та глутамат, як підтримуючу терапію пацієнтів з гострим панкреатитом. Розроблено новий параметр оцінки адаптаційної здатності мітохондрій, а саме стабільність роз'єданого дихання. Його можна використовувати також для характеристики життєздатності клітин. Створено нові програмні пакети і макроси, які забезпечують автоматизацію, надійність та неупередженість аналізу записів дихання та фотографій флуоресцентної мікроскопії клітин.

Ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків, що сформульовані в дисертації

Положення, висновки і рекомендації дисертації є науково обґрунтованими, логічно випливають з поставлених завдань і отриманих результатів досліджень, базуються на достатньому експериментальному матеріалі. Мета і завдання дисертаційної роботи дозволяють повністю

розкрити проблему дослідження. Кількість експериментів у серіях достатня для обґрунтування результатів і підтвердження їх вірогідності, що дало можливість вирішити поставлені наукові задачі.

Позитивними рисами роботи вважаю надійну автоматизацію процесу аналізу записів споживання кисню за допомогою електрода Кларка, що забезпечує високу якість та неупередженість аналізу записів дихання. Вартий уваги професійний підхід автора до статистично-математичного аналізу отриманих даних. Все відмічене робить дисертацію достатньою мірою наукоємною, а її положення аргументованими. Наведені в кінці роботи висновки впливають із завдань і є правомірними. Рисунки демонстративні, наведена коректна статистична обробка одержаних даних.

Недоліки, зауваження та дискусійні питання щодо змісту та оформлення дисертації

При позитивній оцінці дисертаційної роботи слід вказати на недоліки та поставити декілька запитань для ініціювання наукової дискусії:

1. Автору слід було більш чітко дати визначення адаптаційної здатності мітохондрій. Це дало б переконливу аргументацію доцільності дослідження саме максимальної швидкості і стабільності роз'єданого дихання з метою оцінки цієї здатності. Важливим в цьому сенсі є аналіз синтезу АТР за дії досліджуваних чинників, який не було проведено.

2. Ряд експериментів носить багатофакторний характер. Тому при аналізі результатів важко зробити висновки про парціальний внесок окремих факторів.

3. В експериментальній частині занадто багато уваги приділяється негативним результатам. Так, в таблицях та окремих рисунках наводяться експериментальні дані, які не мають вірогідних відмінностей. Ці результати можна було б обговорювати в тексті.

4. В методичній частині часто-густо відсутні посилання на відповідні роботи, де ці методичні прийоми і підходи були вперше запропоновані.

5. Зустрічають невдалі вирази: первинні агоністи, популярна модель, придушена флуоресценція. Ступінь пермеабілізації гепатоцитів дигітоніном не може залежати від їх дихання, як зазначено на рис. 3.56.

6. В розділі «Огляд літератури» доречною була б заключна частина, де акцентується увага на невирішених питаннях, яким присвячена експериментальна частина роботи.

7. Рисунок 3 в авторефераті перевантажений. В авторефераті (пункт сьомий) наведено зайві методичні деталі; це ж стосується таблиці 5.

8. Рисунки 3.23, 3.43, 3.45 виконані недостатньо якісно.

9. Апробація результатів могла би бути більш адекватною докторській дисертації. Переважають студентські конференції.

Запитання для дискусії:

1. Чи можуть досліджувані амінокислоти і інші субстрати окиснення діяти на мітохондрії опосередковано, впливаючи на цитозольні метаболічні процеси?

2. Чи може дія аргініну на моделі гострого панкреатиту бути пов'язана з його розщепленням аргіназою та подальшим метаболізмом орнітину з утворенням поліамінів?

3. За яким механізмом монометилсукцинат стимулює дихання, якщо він є інгібітором сукцинатдегідрогенези?

4. Чи достатній час вживання етанолу щурами в Ваших експериментах для прояву його негативної дії?

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам

Дисертаційна робота Манька Богдана Олексійовича на тему «Адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози та гепатоцитів щурів» є завершеною науковою працею, в якій наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення актуальної наукової проблеми, яка полягає у з'ясуванні біохімічних механізмів адаптації мітохондрій

ацинарних клітин підшлункової залози та гепатоцитів до фізіологічних та патологічних стимулів. 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 п.п. 7 та 9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», що затверджений постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17.11.2021. Вважаю, що Манько Богдан Олексійович **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.

