

ВІДГУК офіційного опонента
на дисертаційну роботу Манька Богдана Олексійовича
“Адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози
та гепатоцитів щурів”
на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
за спеціальністю 03.00.02 - біохімія

Дисертаційне дослідження Манька Б. О. присвячене дослідженню адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози та гепатоцитів щурів за різних метаболічних, гормональних і патофізіологічних впливів. Робота виконана на високому науково-методичному рівні, базується на значному обсязі експериментальних даних і характеризується системним підходом до аналізу мітохондріальної біоенергетики *in situ*. Загалом дослідження справляє позитивне враження, має чітко виражену біохімічну спрямованість і відповідає сучасним вимогам до експериментальних робіт.

Актуальність обраної теми дисертаційного дослідження

Тематика є актуальною для сучасної біохімії та клітинної біоенергетики, зокрема у контексті метаболічних порушень, токсичних впливів (етанол), нутрієнтної регуляції та мітохондріальної дисфункції. Мітохондрії є ключовими регуляторами клітинного метаболізму, життєздатності та загибелі клітин, а порушення їх функцій лежать в основі багатьох метаболічних і токсичних уражень печінки та підшлункової залози. Дослідження адаптаційних механізмів мітохондрій у клітинах з високою метаболічною активністю є важливим як з фундаментальної, так і з прикладної точки зору у сучасній біохімії та медицині.

Особливої актуальності темі надає аналіз впливу етанолу, амінокислот і субстратів окиснення, що має безпосередній зв'язок із проблемами метаболічних захворювань, панкреатиту та гепатопатій. Дослідження охоплює різні типи клітин (гепатоцити, ацинарні клітини), різні субстрати окиснення, фізіологічні та патогенетичні чинники (етанол, амінокислоти, дієти). Позитивно слід відзначити використання пермеабілізованих клітин, аналіз стабільності роз'єданого дихання, застосування автоматизованих алгоритмів обробки даних (Python, ImageJ).

Зв'язок наукової роботи з науковими планами, темами.

Фаховий рівень дисертаційної роботи засвідчується її виконанням згідно з планами науково-дослідної роботи 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 дістарних 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).

Структура та обсяг дисертації.

Робота має традиційну структуру та містить анотацію, вступ, чотири розділи основної частини (“Огляд літератури”, “Матеріали та методи дослідження”, “Результати досліджень та їх обговорення”, “Узагальнення і критичний аналіз результатів”), висновки, список цитованої літератури. Дисертацію ілюструють 72 рисунки і 22 таблиці. Співвідношення між обсягом складових дисертаційної роботи відповідає рекомендованим. Повний обсяг дисертації становить 252 сторінки.

У *вступі* коректно обґрунтовано актуальність дисертаційного дослідження, сформульовано мету, завдання, вказані методи дослідження. Відображення наукової новизни, теоретичного і практичного значення роботи відповідає

отриманим результатам. Наведені дані про особистий внесок здобувача, його публікації, структуру дисертації, апробацію роботи.

Розділ 1 Огляд літератури представлено на 19 сторінках тексту, він складається з п'яти підрозділів, хоча у змісті заявлено лише чотири. Автор аналізує сучасні уявлення про центральну роль мітохондрій у метаболізмі, адаптації та патології печінки й підшлункової залози. Проте Огляд літератури акцентує увагу переважно на функціональних аспектах, тоді як сучасні молекулярні концепції адаптації мітохондрій представлені недостатньо. Детально описані методологічні підходи до дослідження мітохондріального дихання в ізольованих мітохондріях і клітинах, з акцентом на аналіз потоків окиснення за швидкістю споживання кисню. Представлено особливості біоенергетичних процесів у печінці, зокрема роль мітохондрій у гліюконеогенезі, ліпогенезі, кетогенезі та детоксикації етанолу. Значна увага приділена участі мітохондрій у патогенезі алкогольної хвороби печінки, включно з адаптивними та патологічними змінами дихання, мембранного потенціалу, стеатозом і мітофагією. Також детально охарактеризовано біоенергетику ацинарних клітин підшлункової залози, їх енергетичні субстрати, Ca^{2+} -залежну регуляцію секреції та роль мітохондрій у цих процесах. Окремий розділ присвячений ролі порушень мітохондріальних функцій у розвитку гострого панкреатиту за дії алкоголю, жовчних кислот, гормональної гіперстимуляції та генетичних чинників.

Огляд літератури добре охоплює класичні джерела, однак недостатньо представлені сучасні міжнародні концепції мітохондріальної пластичності та метаболічної гнучкості (mitochondrial fitness, hormesis, metabolic flexibility). Огляд літератури значною мірою базується на власних публікаціях автора, тому робота виглядає дещо автороцентричною. У багатьох місцях відсутні посилання на літературні джерела. У кінці розділу немає підсумкових ремарок.

Розділ 2 “Матеріали та методи дослідження” містить 22 підрозділи, у яких детально описана схема дослідження, умови та серії експериментів, матеріали та реагенти, використані в експериментах, а також біохімічні, морфологічні, цитологічні, статистичні і математичні методи та авторські алгоритми, використані у дисертаційній роботі.

У третьому розділі “*Результати досліджень та їх обговорення*”, який включає вісім підрозділів, представлені результати досліджень мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози та гепатоцитів, які здатні адаптуватись до фізіологічних та патологічних стимулів, зокрема змінюючи окисну здатність. Їхню адаптаційну здатність найкраще характеризує максимальна швидкість та стабільність роз’єданого дихання, що у значній мірі залежить від здатності клітин транспортувати і катаболізувати субстрати окиснення для забезпечення достатньої швидкості генерації відновлювальних еквівалентів і підтримання мембранного потенціалу.

У підрозділі 3.1 описано розробку та валідацію автоматизованого програмного алгоритму для аналізу записів споживання кисню ізольованими клітинами та мітохондріями. Проведено порівняння точності й відтворюваності алгоритмів із експертними оцінками, показавши перевагу авторського «човникового» алгоритму, особливо за умов шумних або складних записів. Робота обґрунтовує доцільність автоматизації аналізу мітохондріального дихання для зменшення суб’єктивності та підвищення надійності результатів. На створений авторський пакет варто було б оформити впровадження.

Розроблено прості та швидкі алгоритми сегментації й аналізу клітинної флуоресценції, адаптовані до різних експериментальних умов. Алгоритм з посиленням виявленням ефективний для створення та подальшого коригування первинних масок, тоді як алгоритм з усуненням розмиття оптимальний для безпосереднього аналізу завдяки низькому рівню хибнопозитивних результатів.

У підрозділі 3.2 викладено результати досліджень про те, як тип і комбінація субстратів окиснення визначають адаптаційну здатність мітохондрій ізольованих ацинарних клітин підшлункової залози за умов деполяризації, індукованої протонофором FCCP. Показано, що глюкоза, піруват і особливо глутамін підвищують максимальну швидкість і стабільність роз’єданого дихання, впливаючи на кінетику дихання та мембранний потенціал мітохондрій. Зроблено висновок, що ключовими чинниками адаптації є транспорт і швидкість окиснення субстратів, а оптимальна їх комбінація зменшує деполяризацію та підвищує функціональну стійкість мітохондрій.

Описані результати впливу ацетилхоліну, холецистокініну та інсуліну на мітохондріальне дихання й адаптаційну здатність ацинарних клітин підшлункової залози. Показано, що ацетилхолін і холецистокінін підвищують окисну здатність мітохондрій переважно за рахунок активації окиснення пірувату, тоді як інсулін стимулює метаболізм глюкози та може антагонізувати дію холецистокініну. Зроблено висновок, що субстратне забезпечення є ключовим чинником енергетичної адаптації ацинарних клітин під час стимуляції секреції.

Аналізується зв'язок між життєздатністю ізольованих ацинарних клітин підшлункової залози та параметрами їх мітохондріального роз'єданого дихання. Показано, що стабільність роз'єданого дихання є більш чутливим і надійним показником клітинного ушкодження, ніж традиційні методи оцінки життєздатності.

Підрозділ 3.3 присвячений дослідженню впливу пірувату та глутаміну на мітохондріальні функції, життєздатність і морфологію ацинарних клітин підшлункової залози за дії етанолу та холецистокініну. Показано, що дефіцит субстратів окиснення *in vitro* підвищує вразливість клітин до некрозу, тоді як наявність пірувату і/або глутаміну має виражений захисний ефект. Встановлено, що піруват є ключовим для стимуляції мітохондріального дихання при секреторній активації, тоді як глутамін за певних умов може знижувати роз'єдане дихання. Продемонстровано, що комбінована дія етанолу й ХЦК порушує мітохондріальну функцію та посилює блебінг клітин, але ці ефекти значною мірою залежать від складу середовища. Отримані результати ставлять під сумнів коректність моделей токсичності *in vitro* без адекватного субстратного забезпечення та підкреслюють роль метаболічного контексту в патогенезі панкреатиту.

У **підрозділі 3.4** описана роль різних амінокислот як джерел енергії для ацинарних клітин підшлункової залози та їхній вплив на мітохондріальне дихання і життєздатність клітин. Показано, що мітохондрії здатні окиснювати глутамат, глутамін, аланін, лізин і аспартат, однак ефективність і безпечність цих амінокислот суттєво відрізняється. Встановлено, що глутамат і аланін є найбільш перспективними та відносно безпечними субстратами енергії, тоді як лізин, аргінін і глутамін у високих концентраціях проявляють токсичність і

спричиняють некроз клітин. Показано, що умови середовища та тривалість дії амінокислот суттєво впливають на клітинні відповіді, включно з морфологічними змінами. Отримані результати мають значення для розуміння метаболізму ацинарних клітин і потенційного застосування амінокислот у підтримуючій терапії гострого панкреатиту.

У *підрозділі 3.5* представлені результати дослідження впливу внутрішньоочеревинного введення пірувату натрію на перебіг аргінін-індукованого гострого панкреатиту у щурів, з акцентом на морфологічний стан підшлункової залози та амінокислотний склад плазми крові. Показано, що панкреатит супроводжується вираженими порушеннями амінокислотного профілю, подібними до змін, описаних у пацієнтів з гострим панкреатитом. Введення пірувату не призводило до чітко вираженого морфологічного покращення підшлункової залози, однак частково нормалізувало рівні низки незамінних і замінних амінокислот у плазмі. Отримані дані свідчать про потенційний підтримувальний метаболічний ефект пірувату та обґрунтовують доцільність подальших досліджень його терапевтичного застосування.

У *підрозділі 3.6* висвітлені результати дослідження про вплив типу субстрату окиснення та способу ізолювання гепатоцитів на адаптаційну здатність їхніх мітохондрій. Показано, що піруват і сукцинат найефективніше підвищують максимальну швидкість і стабільність роз'єданого дихання, тоді як глюкоза практично не впливає на мітохондріальне дихання. Встановлено, що гепатоцити, ізолювані методом перфузії печінки *in situ*, мають значно вищу адаптаційну здатність мітохондрій порівняно з клітинами, отриманими *in vitro*.

Також подані результати дослідження впливу етанолу та циклоспорину А на мітохондріальне дихання й адаптаційну здатність гепатоцитів за різних умов субстратного забезпечення. Показано, що етанол лише незначно стимулює базальне дихання, не впливаючи на роз'єдане дихання, тоді як циклоспорин А не змінює мітохондріальні параметри та не взаємодіє з етанолом. Зроблено висновок, що ефекти етанолу *in vitro* не пов'язані з порою перехідної провідності, рівнем НАД(Ф)Н чи мембранним потенціалом мітохондрій. Досліджено вплив активації мітохондріальної пори перехідної провідності йонами Ca^{2+} на окисне фосфорилування та роз'єдане дихання пермеабілізованих гепатоцитів.

Показано, що підвищення Ca^{2+} пригнічує дихання мітохондрій, а циклоспорин А частково або повністю запобігає цим ефектам залежно від субстрату окиснення.

У *підрозділі 3.7* описані результати впливу двотижневого хронічного введення етанолу на тлі високожирової дієти на функціональний стан мітохондрій гепатоцитів і панкреатичних ацинусів щурів. Показано, що етанол суттєво підвищує базальне та максимальне мітохондріальне дихання гепатоцитів, що свідчить про їх адаптацію до алкогольного навантаження. Натомість у панкреатичних ацинусах мітохондріальне дихання не змінюється, хоча секреторна відповідь клітин істотно пригнічується. Отримані дані свідчать, що короткотривале хронічне вживання алкоголю не ушкоджує мітохондрії підшлункової залози і, ймовірно, не є безпосередньою причиною алкогольного індукованого панкреатиту.

Останній *підрозділ 3.8* присвячений впливу 7-тижневого споживання раціонів з високим вмістом жирів або жирів і цукру на метаболічні показники та мітохондріальні функції печінки й підшлункової залози щурів. Показано, що такі дієти не спричиняють ожиріння, значних порушень ліпідного обміну чи змін мітохондріального дихання в печінці. У панкреатичних ацинусах виявлено лише помірне зниження базального дихання за високожирової дієти без ознак порушення мембранного потенціалу або окисного фосфорилування. Загалом результати свідчать, що короткотривалі високожирові та високожирово-вуглеводні раціони не викликають суттєвого ушкодження мітохондрій цих органів.

У *четвертому розділі “Узагальнення і критичний аналіз результатів”* проведено ретельний і послідовний аналіз отриманих результатів порівняно з сучасними джерелами літератури. Обґрунтована концепція адаптаційної здатності мітохондрій шляхом введення показника – стабільності роз’єданого дихання – та обґрунтуванню його фізіологічного і методологічного значення на рівні інтактних клітин, проте дещо обмежена стандартизація та певна суб’єктивність методів кількісної оцінки стабільності. Представлений системний аналіз на різних експериментальних рівнях, показаний чіткий зв’язок між біоенергетикою, життєздатністю клітин і клінічними перспективами.

Встановлено, що максимальна швидкість роз'єднаного дихання відображає лише короточасну здатність клітин окиснювати доступний пул субстратів, тоді як стабільність краще характеризує реальну функціональну витривалість мітохондрій і пов'язана з транспортом та метаболізмом субстратів. Також проведено порівняльний аналіз мітохондрій печінки та підшлункової залози і обґрунтовано терапевтичний потенціал енергетичних субстратів (пірувату, глутаміну, амінокислот) для підвищення життєздатності клітин, з акцентом на гострий панкреатит, проте кількість переконливих *in vivo* та клінічних підтверджень запропонованої терапевтичної стратегії є недостатньою.

У роботі відсутня чітко сформульована центральна наукова гіпотеза. Замість цього подано низку паралельних тверджень і результатів, що ускладнює сприйняття логіки дослідження, створює враження компілятивності, а не концептуальної цілісності. Хоча робота містить великий обсяг функціональних даних (дихання, мембранний потенціал, життєздатність), молекулярні механізми залишаються недостатньо розкритими: відсутній аналіз ролі окремих комплексів дихального ланцюга мітохондрій; майже не обговорюється участь активних форм кисню, кальцієвого гомеостазу, відсутні дані щодо експресії ключових білків або ферментної активності. Структура розділу місцями перевантажена деталями методів і повтореннями, що знижує читабельність і ускладнює сприйняття основних висновків.

На основі проведених досліджень дисертант формулює 8 висновків, які відповідають поставленим завданням та повною мірою відображають результати роботи. Проте у роботі матеріал подано у вигляді послідовного викладу результатів та їх інтерпретації, що створює враження описовості й ускладнює розуміння логіки дослідження. Внаслідок цього висновки часто мають описовий, а не причинно-наслідковий характер.

Список використаних джерел налічує 356 посилання, кожне з яких коректно цитується у тексті рукопису дисертаційної роботи. Усі посилання взято з міжнародних наукових джерел, переважна більшість з них припадає на публікації останніх років.

У дисертації наявний **додаток**, який містить інформацію про публікації автора, у яких представлені основні результати дисертації, відомості про апробацію результатів досліджень, патенти на корисну модель за результатами дисертації.

Обґрунтованість та достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Усі експериментальні результати, наукові положення і висновки побудовані на матеріалах власних досліджень. Робота виконана з використанням сучасних експериментальних методів досліджень, які є науково обґрунтованими і достовірними. Це дозволило провести кваліфіковані вимірювання, що відповідає поставленим завданням, а проведений статистичний аналіз отриманих результатів дозволяє оцінити їх та основні наукові положення й висновки досліджень дисертантки як достовірні.

Наукова новизна одержаних результатів

Дисертаційне дослідження має самостійний, системний, цілісний характер і відзначається високим рівнем наукової новизни. Отримані результати розширюють уявлення про метаболічну пластичність мітохондрій і доповнюють сучасні концепції клітинної біоенергетики. Наукова новизна роботи полягає у запровадженні підходу до оцінки адаптаційної здатності мітохондрій на основі аналізу максимальної швидкості та стабільності роз'єданого дихання. Здійснено систематичне порівняння особливостей адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих ацинарних панкреатитів і гепатоцитів за різних умов. Вперше експериментально доведено роль окремих амінокислот як субстратів мітохондріального окиснення в ацинарних клітинах підшлункової залози; виявленні клітинно-специфічних відмінностей адаптаційних реакцій мітохондрій гепатоцитів і панкреатитів; встановленні токсичних ефектів високих концентрацій окремих амінокислот на рівні мітохондріальної функції та клітинної життєздатності.

Запропоновано новий підхід до оцінки адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих клітин, що ґрунтується на поєднанні аналізу максимальної швидкості та стабільності роз'єданого дихання. Показано, що наявність додаткових

субстратів окиснення підвищує стабільність роз'єданого дихання, тоді як неоптимальні умови *in vitro* та окремі метаболіти її знижують. Встановлено субстрат-залежний характер гормональної регуляції мітохондріального дихання в ацинарних клітинах, а також антагоністичний вплив інсуліну на холецистокінін-індуковану активацію. Проведено систематичне порівняння адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних панкреатитів і гепатоцитів, виявивши тканинно-специфічні відмінності у використанні субстратів та чутливості до хронічного введення етанолу. Експериментально обґрунтовано захисну роль пірувату, глутаміну, глутамату та аланіну у підтриманні мітохондріальної функції та життєздатності ацинарних клітин за дії патогенних факторів. Вперше встановлено субстратну специфічність окиснення амінокислот мітохондріями панкреатитів та їх диференційований вплив на життєздатність клітин *in vitro* і *in vivo*.

Практичне значення роботи

Практичне значення роботи полягає у розробці та впровадженні автоматизованих програмних рішень для аналізу мітохондріального дихання та флуоресцентних зображень. Розроблені методичні підходи дають можливість використання запропонованих показників адаптаційної здатності мітохондрій як функціональних маркерів життєздатності клітин, що забезпечує високу точність, швидкість та неупередженість аналізу. Покращено спосіб пермеабілізації клітин печінки для дослідження їх мітохондріального дихання для потенційного застосування методу в експериментальній фармакології, токсикології та біомедичних дослідженнях.

Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях та авторефераті

Результати дисертаційного дослідження опубліковані у 16 статтях, з них – 10 статей у журналах, які індексуються у наукометричною базою Scopus, 3 статті у виданнях, віднесених до другого квартилю (Q2) згідно класифікації Scimago Journal and Country Rank. Видано 3 патенти на корисну модель. Результати дисертації було оприлюднено, що відображено 29 тезами доповідей у збірниках вітчизняних і міжнародних конференцій.

Дискусійні положення, запитання та зауваження щодо змісту та оформлення дисертації

Принципових недоліків у роботі мною не виявлено, але є низка питань дискусійного характеру та зауважень.

1. Поняття «адаптаційна здатність мітохондрій» не має достатньо чіткого біохімічного визначення, що створює методологічну неоднозначність, ускладнює порівняння з іншими дослідженнями та частково може призводити до неоднозначного трактування отриманих результатів. Прошу дати чітке визначення терміну «адаптаційна здатність мітохондрій», провести чітке розмежування між поняттями адаптація, компенсація, функціональний резерв, стрес-відповідь згідно біохімічних маркерів і співвіднести його з існуючими концепціями клітинної біоенергетики.
2. Попри детальний функціональний аналіз дихання, недостатньо обговорюється участь молекулярних механізмів, які можуть лежати в основі спостережуваних функціональних змін (роль комплексів електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, мітохондріальної пори перехідної проникності, кальцієвого гомеостазу, активних форм кисню).
3. Який, на вашу думку, механізм впливу пірувату на зміни вмісту пулу незамінних амінокислот у плазмі крові щурів?
4. Статистичний аналіз виконано коректно в загальних рисах, однак використання мінімально допустимих для біомедичних досліджень вибірок ($n \geq 5$) і програмного забезпечення загального призначення знижує переконливість окремих висновків. Рекомендується чіткіше розмежувати біологічні та технічні повтори в описі методів і статистичного аналізу.
5. Доцільним було б додати узагальнювальну схему або концептуальну модель, яка ілюструє запропоновану концепцію адаптаційної відповіді мітохондрій.
6. Робота не має впроваджень отриманих результатів у навчальний процес, наукову чи практичну діяльність. Зокрема, варто було б оформити патент чи авторське право на програмні пакети і макроси, які дають змогу повністю автоматизувати процес аналізу записів дихання і фотографій флуоресцентної мікроскопії клітин.

7. У роботі відсутній номер протоколу і дата засідання Комісії біоетики біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

Висловлені зауваження і рекомендації не впливають на високу оцінку дисертації Манька Богдана Олексійовича, яка є завершеною ґрунтовною науковою роботою.

Загальний висновок про відповідність дисертаційної роботи встановленим вимогам.

Аналіз дисертації Манька Богдана Олексійовича “Адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози та гепатоцитів щурів” свідчить, що це самостійне, завершене наукове дослідження, яке за актуальністю, науковою новизною, методичним рівнем, обсягом отриманих даних, теоретичною і практичною значимістю, обґрунтованістю висновків відповідає вимогам, передбаченим пунктами 7 та 9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2021 р., а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 - біохімія.

Офіційний опонент

завідувачка кафедри біологічної хімії

ДНП «Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького»

кандидат медичних наук,

доктор біологічних наук, професор

Леся КОБИЛІНСЬКА

