

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію Мерлавського Володимира Михайловича на тему «Ca<sup>2+</sup>-регуляція дихання гепатоцитів за різних функціональних станів організму», що подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин

### 1. Актуальність теми

Дослідження ролі Ca<sup>2+</sup>-сигналізації у процесах регуляції мітохондріального дихання різних клітин організму є актуальним завданням сучасної фізіології. Особливе зацікавлення ці механізми викликають у такому класичному для біоенергетики органі, яким стала печінка після серії статей Чанса і Вільямса, опублікованих у *Journal of Biological Chemistry* в 1955 р. У цих публікаціях Чанс і Вільямс розробили основні принципи полярографічної реєстрації дихання ізольованих мітохондрій, що спричинило справжню революцію у біоенергетиці. Використовуючи цей метод, досліджено особливості мітохондріального дихання та його регуляцію за окиснення різних екзогенних субстратів. Більшість досліджень були проведені на ізольованих мітохондріях, і лише деякі – на інтактних клітинах, бо крізь плазматичну мембрану практично не проникають або погано проникають екзогенні субстрати окиснення і субстрат окисного фосфорилування (АДФ). Але досить важливо з'ясувати особливості дихання неізольованих мітохондрій, які знаходяться в нативному оточенні (такому, як це є у клітинах), за окиснення різних екзогенних субстратів. Особливо тоді, коли мова йде про Ca<sup>2+</sup>-регуляцію мітохондріального дихання. Мітохондрії, як відомо, не лише впливають на генерацію Ca<sup>2+</sup>-сигналу у багатьох клітинах, але і самі є об'єктом цієї регуляції. Власне, адаптований для печінки дисертантом метод – реєстрація дихання мітохондрій у пермеабілізованих гепатоцитах – дозволяє це здійснити.

Крім того, печінка є унікальним органом, де шляхом окиснення відбувається знешкодження великої кількості ендогенних та екзогенних токсинів. За різних функціональних станів організму інтенсивність цих процесів може суттєво змінюватися, у тому числі за розвитку різноманітних патологій. Тому важливо з'ясувати особливості регуляції дихання мітохондрій в умовах, максимально наближених до природних.

З огляду на це, у теоретичному та практичному аспектах з'ясування механізмів Ca<sup>2+</sup>-регуляції мітохондріального дихання у гепатоцитах є актуальним завданням, а кандидатська дисертація Мерлавського В.М. є корисною для фізіологів людини і тварин, біофізиків, біохіміків та клінічних гастроентерологів.

## 2. Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації

Вважаю, що достовірність одержаного дисертантом матеріалу та обґрунтованість висновків, сформульованих у роботі, є достатніми.

Про високий ступінь обґрунтованості основних положень дисертації свідчать наступні аргументи.

1) У ході дослідження було коректно використані адекватні поставленій меті і завданням дисертації методи:

- фізіологічні – дослідження інтенсивності дихання ізольованих гепатоцитів та мітохондрій *in situ*, моделювання гіперінсулемії, цукрового діабету та стану, що виникає після тривалого введення таурину *in vivo*;
- препаративні – отримання ізольованих гепатоцитів та пермеабілізація їхньої плазматичної мембрани;
- фізико-хімічні – полярографічне визначення змін напруження кисню у суспензії клітин, дослідження флуоресценції трипанового синього та родаміну 123;
- біохімічні – визначення активності сукцинатдегідрогенази, каталази, супероксиддисмутази, вмісту ТБК-активних продуктів;
- кінетичні – розрахунок параметрів рівняння Хілла із застосуванням модифікованих координат Іді-Гофсті;
- статистичні – описова статистика, лінійна регресія, t-тест Стьюдента, F-тест Фішера.

Варто зазначити, що дисертантом вперше застосовано та оптимізовано метод дослідження дихання пермеабілізованих клітин на гепатоцитах, що дозволило досягнути поставної мети.

- 2) Об'єктивність результатів досліджень і висновків підтверджується фактичним матеріалом, який наводиться у експериментальній частині роботи, та ґрунтовність його аналізу. Суттєво полегшує сприймання фактичного матеріалу і проведенню його наукової експертизи велика кількість ілюстративного матеріалу, представленого на 53 рисунках.
- 3) Наукові положення, висновки і рекомендації достатньо повністю висвітлені у 5 статтях, 1 патенті на корисну модель і 7 тезах доповідей на міжнародних та вітчизняних конференціях.
- 4) Основні положення дисертації були успішно апробовані на 7-и наукових форумах в Україні та закордоном (Львів, 2009; 2010; 2012; 2014а; 2014б;



2014с; Одеса, 2010), що переконує у доцільності таких досліджень і значенні отриманих результатів.

### 3. Достовірність і новизна наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації

Результати аналізу фактичних даних, наведених у кандидатській дисертації Мерлавського В.М., їхнього взаємозв'язку і причинно-наслідковості переконливо свідчать про те, що вони є достовірними, новими і пріоритетними. Найбільш цінними, на мій погляд, є такі експериментальні дані.

1. Дисертантом вперше розроблено підходи реєстрації дихання мітохондрій *in situ* для клітин печінки і встановлено, що для ефективної пермеабілізації плазматичної мембрани необхідно враховувати співвідношення між кількостями детергента і клітин, а не його концентрацію. Автором також вперше проведено дослідження впливу вихідного рівня катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  на дихання пермеабілізованих клітин.
2. Показано, що за окиснення екзогенних субстратів найсуттєвіші зміни у диханні мітохондрій *in situ* відбуваються внаслідок збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]$  у середовищі від 0,1 до 1 мкмоль/л.
3. Кінетичні параметри окиснення сукцинату на тлі ротенону не відрізняються за 0,1 і 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі. За окиснення пірувату на тлі малату у пермеабілізованих гепатоцитах з підвищенням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  показники  $V_{max}$  суттєво зростають, а  $K_{0,5}$  значно знижуються.
4. За високих концентрацій і сукцинату, і пірувату за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  розвивається субстратне інгібування окисних процесів мітохондрій *in situ* клітин печінки.
5. Таурин *in vivo* практично не змінює сукцинатстимульованого ротенонне-чутливого дихання пермеабілізованих гепатоцитів у стані  $S_3$ , але частково нівелює відмінності у кінетиці за окиснення пірувату на тлі малату за різних  $[\text{Ca}^{2+}]$ .
6. Встановлено, що субстратне інгібування, яке притаманне залежності швидкості дихання від концентрації пірувату за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі, внаслідок тривалої дії таурину розвивається за вищої, ніж у контролі, концентрації субстрату.
7. Уперше показано, що лише після одноразового введення Уперше виявлено, що на ранніх етапах розвитку цукрового діабету знижується чутливість процесів клітинного дихання клітин печінки до токсичного рівня  $\text{Ca}^{2+}$ .

Отримані результати безсумнівно є важливими для розуміння механізму залежності мітохондріального дихання гепатоцитів від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазмі.

Варто наголосити на високому рівні оформлення дисертації, пунктуальності і послідовності викладення результатів у вигляді рисунків. В обговореннях автор аналізує отримані результати і порівнює їх із даними наукової літератури. Наприкінці дисертації він представляє підсумкову схему на основі власних даних про зв'язки між сигнальними і метаболічними шляхами у гепатоцитах за різного рівня  $\text{Ca}^{2+}$  у внутрішньоклітинному середовищі. Висновки повністю відповідають основним результатам роботи.

#### **4. Запитання, зауваження та рекомендації до дисертації**

У цілому оцінюючи високий теоретичний і методичний рівень дисертації, у процесі рецензування дисертаційної роботи виникли деякі зауваження та ряд запитань стосовно фактичного матеріалу та інтерпретації отриманих даних, які можуть бути предметом дискусії.

1. Тема дисертації є занадто загальною, особливо друга частина. Варто, мабуть, було уточнити у назві, про які функціональні стани йде мова.
2. У тексті дисертації зустрічаються термінологічні неточності, описки і русизми, деякі стилістичні помилки.
3. Для з'ясування механізму дії токсичних концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  на процеси клітинного дихання доречно було б перевірити ці ефекти за інгібування циклоспорином мітохондріальної пори транз'єнтної проникності чи інгібування  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника мітохондрій CGP-371157.
4. Доцільно було б поміряти концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$ , яка при цьому утворюється всередині мітохондрій.

Ці зауваження не знижують теоретичної та практичної цінності роботи і носять швидше рекомендаційний характер.

#### **6. Відповідність дисертації встановленим вимогам**

Дисертаційне дослідження Мерлавського В.М. є завершеною науковою працею, в якій отримано нові науково-обґрунтовані результати, що в сукупності вирішують конкретну наукову задачу і є важливими для фізіології печінки. Оформлення дисертації відповідає вимогам, встановленим МОН України. Науковий зміст автореферату відповідає дисертації.



## 7. Практичне значення результатів дисертаційної роботи

Отримані результати поглиблюють знання про механізми  $\text{Ca}^{2+}$ -регуляції клітинного дихання у печінці. Вони є фундаментальним підґрунтям для розуміння механізмів розвитку різноманітних патологій печінки та пошуку методів лікування. Зокрема, отримані дані можуть бути корисними для подальшого пошуку вирішення проблем терапії таких станів, як гіперінсулінемія і цукровий діабет I типу. Особливо практичне значення має Патент України на корисну модель «Спосіб дослідження дихання мітохондрій *in situ*». Важливо, що деякі положення дисертаційної роботи Мерлавського В.М. впроваджені у навчальний процес і використовуються у Львівському національному університеті імені Івана Франка при викладі матеріалу загального курсу «Фізіологія людини і тварин» та спецкурсів «Фізіологія травлення», «Біоенергетика», «Ендокринологія».

## 8. Висновок

Кандидатська дисертація Мерлавського В.М. є актуальним, завершеним фундаментальним дослідженням в галузі фізіології печінки. У ході виконання цієї роботи дисертантом із використанням адекватних методів були отримані нові оригінальні і вагомні наукові результати щодо регуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріального дихання і окисного фосфорилування у гепатоцитах.

Отже, дисертаційна робота цілком відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, які висувуються до кандидатських дисертацій, а її автор Мерлавський В.М. повністю заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Офіційний опонент –  
завідувач відділу фізіології кровообігу  
Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України  
доктор медичних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України

  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ  
НАН УКРАЇНИ

Підпис	<i>В.Ф. Сагач</i>
Засвідчую.	<i>(б. Керман)</i>
Офіційний секретар	

В.Ф. Сагач