

Відгук
офіційного опонента на дисертаційну роботу
Гренюха Володимира Петровича
«Особливості біоенергетичних процесів у мітохондріях
клітин лімфоми Немет-Келнера»,
що подана до захисту у спеціалізовану вчену раду К 35.051.14
при Львівському національному університеті імені Івана Франка на
здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю
03.00.13 – фізіологія людини і тварин

1. Актуальність обраної теми.

За останні 50 років онкозахворюваність, в тому числі на лімфому, у світі значно виросла. Лікування цих захворювань є ефективним не більше ніж у половині випадків. Така низька ефективність обумовлена неспецифічністю дії протипухлинних препаратів, резистентністю різних пухлин до них та пошкоджуючою дією препаратів на нормальні клітини організму, зокрема на клітини печінки. До цього часу залишається нез'ясованим вплив хіміотерапевтичних препаратів на енергетичні процеси у клітинах новоутворень. Тому дослідження особливостей цих процесів у мітохондріях пухлинних клітин у порівнянні з мітохондріями печінки є важливим для розуміння механізмів неоплазматичних трансформацій. Поряд з цим, вивчення дії різних протипухлинних препаратів на швидкість дихання та окисне фосфорилування в мітохондріях клітин лімфоми та печінки також має велике значення.

Отже, з'ясування особливостей енергетичних процесів у клітинах новоутворень та підвищення ефективності лікування неоплазій є актуальним як для фізіології, так і для медицини.

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

Дисертація виконана на кафедрі фізіології людини і тварин Львівського національного університету імені Івана Франка за підтримки Західно-Українського біомедичного дослідницького центру (WUBMRC) та проекту для молодих учених Львівського національного університету імені Івана Франка підтриманого компанією "Material Phases Data System" (Швейцарія).

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

Основні положення та висновки дисертації обґрунтовані достатньою кількістю якісно проведених досліджень. Автором дисертації чітко окреслені мета та завдання дослідження. Особливо варто відмітити, що завдання дослідження, положення наукової новизни і висновки дисертації є логічно взаємопов'язаними. Результати досліджень отримані автором особисто.

Дисертаційна робота Гренюха В.П. є оригінальною науковою працею, яка виконана на належних методичному та теоретичному рівнях. Робота має

послідовну та логічну структуру і є комплексним та завершеним науковим дослідженням. Зміст роботи та багатогранність висвітленої проблеми свідчать про високий рівень наукової компетентності автора.

Викладене вище свідчить про обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій, що викладені у дисертаційній роботі Гренюха В.П.

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

Сформульовані Гренюхом В.П. основні наукові положення та висновки ґрунтуються на використанні адекватних щодо поставлених завдань методів дослідження, зокрема, фізіологічний (підтримання та перевивання лімфоми NK/Ly), фізико-хімічний (полярографічна реєстрація споживання кисню мітохондріями та клітинами), оптичний (електронна мікроскопія суспензій мітохондрій), біохімічний (визначення АТФазної активності та вмісту білка), статистичні (аналіз достовірності, варіабельності та дисперсії отриманих результатів). Перераховане вище дозволяє оцінити одержані результати, основні наукові положення та висновки глибоких за змістом досліджень, проведених Гренюхом В.П., як достовірні.

Дослідження проведені на білих щурах з дотриманням основних біоетичних положень та міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин.

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

У дисертаційній роботі Гренюха В.П. сформульовано та обґрунтовано ряд положень, висновків і пропозицій, які відзначаються науковою новизною та мають практичну спрямованість. Наукові положення сформульовані автором самостійно та відображають особистий внесок дисертанта у розвиток біологічної науки.

Результати проведених Гренюхом В.П. досліджень розширюють сучасні уявлення про особливості енергетичного метаболізму пухлинних клітин на прикладі лімфоми Немет-Келнера. Вперше були виділені функціонально активні мітохондрії лімфоми NK/Ly зі спряженими процесами дихання та окисного фосфорилування. Виявлено, що мітохондрії лімфоми NK/Ly та мітохондрії печінки можуть бути використані як мішені для порівняння впливу протипухлинних препаратів на енергетичні процеси у пухлинних і нормальних клітинах. З'ясовано закономірності впливу протипухлинних препаратів на енергетичні процеси у мітохондріях лімфоми. Встановлено, що протипухлинні препарати (доксорубіцин, ландоміцин А, Les 3506) викликають пригнічення дихання та окисного фосфорилування у метаболічному стані 3. Зокрема, новий протипухлинний антибіотик ландоміцин А пригнічує енергетичні процеси у мітохондріях лімфоми, але ще більше у мітохондріях печінки щура. Натомість, інгібітор H^+ -АТФази

бафіломіцин та агоніст Ca^{2+} -каналів кислих депо клітин НААДФ призводять до селективного пригнічення енергетичних процесів у мітохондріях лімфоми без вірогідного впливу на мітохондрії печінки.

6. *Практичне значення одержаних результатів.*

Отримані Гренюхом В.П. результати поглиблюють знання про закономірності функціонування енергетичних процесів у пухлинних клітинах. Вони є фундаментальними для з'ясування механізмів резистентності клітин новоутворень до дії протипухлинних препаратів та підвищення ефективності лікування. Отримані результати можуть бути застосовані для обґрунтування можливості використання певних протипухлинних препаратів за лікування злоякісних новоутворень. У ході виконання дисертаційної роботи була розроблена програма MitoDancer для точного аналізу полярографічних записів. Основні положення дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес і використовуються в Львівському національному університеті імені Івана Франка на загальних курсах «Фізіологія людини і тварин» та спецкурсах «Неоплазія» та «Біоенергетика». Методичні та експериментальні розробки можуть бути застосовані для підготовки спеціалістів медико-біологічного профілю у вищих навчальних закладах України.

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

За темою дисертації опубліковано 6 статей у фахових наукових журналах і 8 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних конференціях. Публікації та автореферат у повній мірі відображають зміст дисертаційної роботи. Основні наукові положення дисертаційного дослідження повністю викладені у представлених публікаціях та обговорені на наукових зібраннях.

Всі розділи автореферату повторюють матеріали дисертаційної роботи, де автором чітко, послідовно у лаконічній формі викладені основні положення, висновки та одержані результати дослідження. Автореферат дисертації оформлений згідно вимог ДАК України.

Матеріали дисертаційної роботи Гренюха В.П. пройшли апробацію на конференціях.

8. *Структура дисертації.*

Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів дослідження з їх обговоренням, узагальнення, списку використаних літературних джерел. Робота викладена на 125 сторінках друкованого тексту, ілюстрована 19 рисунками та 17 таблицями. Список літератури включає 218 найменувань.

Дисертація виконана державною мовою, якою автор володіє досконало. Стиль дисертації відповідає вимогам, що висуваються до наукових праць такого рівня, а також відзначається логічністю, послідовністю, системністю, обґрунтованістю. Структура дисертації цілком узгоджується з її назвою,

метою і завданнями дослідження. Зміст та результати роботи відповідають паспорту спеціальності 03.00.13 – фізіологія людини і тварин, зокрема фізіології вісцеральних систем.

Об'єкти та методи дослідження повністю відповідають основним напрямкам роботи. У дисертаційному дослідженні використані високоінформативні методи фізіологічних, фізико-хімічних, оптичних і біохімічних досліджень та методи математичної статистики.

В огляді літератури надано логічний та структурований аналіз сучасних наукових публікацій із досліджуваної проблеми. Узагальнено сучасні дані про метаболізм лімфом. Проаналізовано особливості мітохондрій пухлинних клітин. Проаналізовано особливості ключових енергетичних процесів у циклі Кребса та дихальному ланцюзі мітохондрій. Детально розглянуто потенційну роль мітохондрій як мішеней за дії протипухлинних препаратів.

У розділі «Матеріали та методи досліджень» описана загальна організація досліджень. Основна частина роботи виконана на штамі мишачої лімфоми NK/Ly. Асцит отримували способом дренажу черевної порожнини анестезованих ефіром мишей. Мітохондрії клітин NK/Ly виділяли методом диференційного центрифугування. Клітини лімфоми осаджували із асциту центрифугуванням.

Використані методики підтримання та перевивання лімфоми NK/Ly, полярографічної реєстрації споживання кисню мітохондріями та клітинами, електронної мікроскопії суспензій мітохондрій, визначення АТФазної активності та вмісту білка. Описані також методи статистичної обробки експериментальних даних: аналіз достовірності, варіабельності та дисперсії отриманих результатів. Всі застосовані методи та методики є об'єктивними, відповідають меті та завданням дисертаційної роботи.

У розділі результатів власних досліджень логічно, структуровано викладені отримані дисертантом результати. Перший підрозділ присвячений визначенню максимальної окисної здатності клітин NK/Ly. Другий – особливостям виділення та морфологічному аналізу мітохондрій лімфоми. Третій – порівнянню особливостей дихання та окисного фосфорилування мітохондрій та клітин лімфоми NK/Ly, мітохондрій печінки миші і щура. Четвертий присвячений впливу доксорубіцину на дихання та окисне фосфорилування мітохондрій лімфоми NK/Ly. П'ятий – ефекту Les 3506 на дихання та окисне фосфорилування мітохондрій печінки щура. Шостий – впливу ландоміцину А на дихання та окисне фосфорилування у мітохондріях лімфоми NK/Ly і печінки щура. Сьомий – дії бафіломіцину А1 та НААДФ на дихання і окисне фосфорилування мітохондрій лімфоми NK/Ly і печінки щура. Рівень викладення та аналізу матеріалу у цих розділах вказує на належну фахову підготовку дисертанта.

У розділі аналізу та узагальнення результатів досліджень Гренюх В.П., спираючись на літературні дані, обговорює можливі фізіологічні механізми отриманих результатів.

9. Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення.

Оцінюючи в цілому дисертаційну роботу Гренюха В.П., слід зазначити, що серйозних недоліків, які ставлять під сумнів отримані дисертантом основні висновки, дана робота не містить. але вона містить деякі питання дискусійного характеру.

1. У роботі відсутні відомості щодо кількості використаних у дослідах тварин та їхньої статі.
2. На рис.2.3, судячи з приміток, поряд з чорними повинні бути і кольорові (зокрема, червоні) лінії графічного запису полярограми, але представлений рисунок, як і має бути у дисертаціях, чорно-білий, а це, у свою чергу, утруднює ідентифікацію зображених на ньому ліній. До того ж, чомусь на графіку концентрація кисню подана в умовних одиницях, хоча напруження кисню подається у мм рт.ст.
3. Хотілося б почути від автора більш конкретно, яким чином визначали швидкість споживання кисню досліджуваними клітинами.
4. Автор вказує на те, що «інтенсивність та спряженість процесів окисного фосфорилування у мітохондріях лімфоми є суттєво нижчими, ніж у мітохондріях печінки» і далі стверджує, що «швидкоростучі пухлини легко стають гіпоксичними внаслідок непристосованості їхньої судинної системи для постачання достатньої кількості кисню». Але таке заключення є не зовсім коректним. По-перше, в пухлинах (у т.ч. й лімфомах) мікроциркуляція крові більш інтенсивна, ніж в здорових тканинах, а тому постачання кисню до них буде кращим. І, по-друге, швидкість споживання кисню в ліфомах знижується. У такому випадку в пухлинах аж ніяк не може розвиватись гіпоксія. Остаточну відповідь на це питання може дати реєстрація напруження кисню в лімфомах.
5. Заключення автора (стор.69) про те, що «доксорубіцин сповільнює дихання у мітохондріях лімфоми миші» справедливий лише для дози даного антибіотика 1 мкмоль/л, адже за інших комбінацій дози та субстратів дихальний контроль не змінювався. До того ж, саме висока доза препарату може пошкоджувати мембрани мітохондрій досліджуваних клітин аналогічно кардіоміоцитам.
6. Щодо висновків до дисертаційної роботи. У висновку 6 написано, що «ландоміцин А викликає тенденцію до змін». Але це ні про що не говорить, бо зміни ці були не вірогідні. У висновках пишуть про певні зміни, якщо вони статистично вірогідні, у протилежному випадку пишуть, що зміни були відсутні.
Висновок 9 частково пвтурює висновок 2, що є не зовсім коректним.
7. У тексті дисертації подана велика кількість скорочень термінів, але у переліку умовних позначень більшість їх відсутня, а деякі скорочення у тексті мають іншу послідовність букв порівняно з переліком. Все це створює певні труднощі при ознайомленні з роботою.

Викладені зауваження та запитання не мають принциповий характер та не знижують позитивну оцінку дисертації в цілому, а також розроблених автором основних наукових положень, висновків та одержаних результатів досліджень.

Висновок

Дисертаційна робота Гренюха Володимира Петровича «Особливості біоенергетичних процесів у мітохондріях клітин лімфоми Немет-Келнера», є завершеним, оригінальним, самостійним науковим дослідженням, що висвітлює актуальну тему і має вагоме теоретичне та практичне значення. За рівнем наукової новизни подані у дисертаційній роботі результати відповідають вимогам, що висуваються до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата наук. Тема роботи, об'єкт та предмет дослідження, її зміст, а також положення та висновки відповідають паспорту спеціальності 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. У дисертаційній роботі містяться раніше не захищені наукові положення.

Таким чином, на підставі аналізу дисертації Гренюха В.П., автореферату дисертації, публікацій дисертанта у фахових наукових виданнях можна зробити висновок, що дисертаційна робота виконана на належному теоретичному і методичному рівні, відповідає вимогам щодо дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, зокрема пп. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, а автор дисертації – Гренюх Володимир Петрович заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Офіційний опонент -
доктор біологічних наук, професор,
Навчально-науковий центр “Інститут біології”
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка,
професор кафедри фізіології людини і тварин

П.І. Янчук

Підпис проф. Янчука П.І. засвідчую:

Вчений секретар НДЧ
Київського національного
університету імені Тараса Шевченка

Н.В. Караульна