

Відгук

офіційного опонента на дисертаційну роботу
Мерлавського Володимира Михайловича
«Ca²⁺-регуляція дихання гепатоцитів за різних
функціональних станів організму»,

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.

Процеси енергозабезпечення клітини мають надзвичайно важливе значення у життєдіяльності організму. Істотний вплив них здійснюють іони Ca²⁺. Порушення взаємозв'язків між цими процесами у клітинах печінки може бути пов'язаним з розвитком деяких патологічних станів організму, зокрема, ожиріння або цукрового діабету. Але до нинішнього часу лишається не з'ясованою роль Ca²⁺-регуляції дихання мітохондрій *in situ* в гепатоцитах за умов збереження їхніх морфо-функціональних зв'язків з іншими органелами, що є важливим з огляду на тісний контакт мітохондрій з ендоплазматичним ретикулумом та комплексом Гольджі, а також у зв'язку з тим, що окисне фосфорилування регулюється сусідніми органелами завдяки зміні концентрації Ca²⁺ у цитозолі та споживання АТФ.

Таурин належить до найбільш поширених аміносурьфонових кислот у ссавців і задіяний у підтриманні Ca²⁺-гомеостазу та функціонування мітохондрій. Але особливості окиснення різних субстратів у мітохондріях пермеабілізованих клітин під впливом таурину та за різних концентрацій Ca²⁺ є недослідженими.

Провідну роль у метаболізмі вуглеводів відіграє інсулін, який забезпечує регуляцію транспортування глюкози через плазматичну мембрану багатьох клітин, але не гепатоцитів. Поряд з цим, інсулін збільшує активність піруватдегідрогенази клітин печінки, підвищує максимальну здатність мітохондрій скелетних м'язів синтезувати АТФ. Але немає відомостей щодо впливу інсуліну на окисні процеси у мітохондріях *in situ* ізольованих клітин печінки. А відомості стосовно змін процесів енергетичного забезпечення у мітохондріях за умов цукрового діабету є суперечливими.

Тому дослідження взаємозв'язків між процесами клітинного сигналювання та метаболічними шляхами за різних функціональних станів організму є надзвичайно актуальним.

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

Дисертація виконана на кафедрі фізіології людини і тварин біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка у рамках науково-дослідних тем: “Роль фізіологічно активних пептидів у функціонуванні секреторних клітин травних залоз” (2008–2009

рр., № держреєстрації 0108U000747), “Розробка тест-системи для з’ясування взаємозалежності функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем і мітохондріального дихання *in situ*” (2010–2011 рр., № держреєстрації 0110U001356), “Вплив таурину на функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем і мітохондріальне дихання секреторних клітин” (2012–2013 рр., № держреєстрації 0112U001264) та за часткової підтримки Західно-Українського біомедичного дослідницького центру (WUBMRC).

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 Мерлавського В.М. 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 і висновків, що викладені у дисертаційній роботі Мерлавського В.М.

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

Сформульовані Мерлавським В.М. основні наукові положення та висновки ґрунтуються на використанні адекватних щодо поставлених завдань методів дослідження, зокрема, фізіологічних, препаративних, фізико-хімічних, біохімічних, кінетичних, описової та порівняльної статистики. Перераховане вище дозволяє оцінити одержані результати, основні наукові положення та висновки глибоких за змістом досліджень, проведених Мерлавським В.М. 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 Мерлавського В.М. 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.

Вперше встановлено, що для ефективної пермеабілізації плазматичної мембрани необхідно враховувати співвідношення між кількостями детергента і клітин, а не його концентрацію; оптимальне співвідношення між кількістю дигітоніну та кількістю гепатоцитів у суспензії для дослідження дихання мітохондрій *in situ* становить 20–22 мкг на 1 млн клітин. Автором показано, що за окиснення як сукцинату, так і суміші малату, глутамату і пірувату найсуттєвіші зміни окисних процесів відбуваються внаслідок збільшення $[Ca^{2+}]$ у середовищі від 0,1 до 1 мкмоль/л. Встановлено, що залежність швидкості дихання мітохондрій *in situ* гепатоцитів від концентрації як сукцинату, так і пірувату на фоні малату описується рівнянням Хілла. Виявлено, що за окиснення пірувату на тлі малату у пермеабілізованих гепатоцитах з підвищенням концентрації Ca^{2+} показники V_{max} суттєво зростають, а $K_{0.5}$ знижуються. За високих концентрацій і сукцинату, і пірувату за 1 мкмоль/л Ca^{2+} розвивається субстратне інгібування окисних процесів мітохондрій *in situ* клітин печінки. Виявлено, що таурин *in vivo* практично не змінює сукцинатстимульованого ротеноннечутливого дихання пермеабілізованих гепатоцитів у стані S_3 , але частково нівелює відмінності у кінетиці за окиснення пірувату на тлі малату за різних $[Ca^{2+}]$. Встановлено, що субстратне інгібування, яке притаманне залежності швидкості дихання від концентрації пірувату за 1 мкмоль/л Ca^{2+} у середовищі, внаслідок тривалої дії таурину розвивається за вищої, ніж у контролі, концентрації субстрату. Показано, що після одноразового введення інсуліну *in vivo* швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів у стані S_3 за окиснення сукцинату й α -кетоглутарату збільшується, а за короткочасної дії цього гормону *in vitro*, чи після 6- і 12-денного введення *in vivo* – залишається незмінною. Уперше виявлено, що на ранніх етапах розвитку цукрового діабету знижується чутливість процесів клітинного дихання клітин печінки до токсичного рівня Ca^{2+} .

6. Практичне значення одержаних результатів.

Одержані Мерлавським В.М. результати поглиблюють знання про закономірності енергетичних процесів у клітинах печінки та вплив на них Ca^{2+} . За результатами дослідження оформлено Патент України на корисну модель “Спосіб дослідження дихання мітохондрій *in situ*”. Отримані дані можуть бути корисними для подальшого пошуку вирішення проблем терапії таких станів, як гіперінсулінемія і цукровий діабет I типу.

Основні положення дисертаційної роботи впроваджені у навчальний процес і використовуються у Львівському національному університеті імені Івана Франка при викладі загального курсу “Фізіологія людини і тварин” та спецкурсів “Фізіологія травлення”, “Біоенергетика”, “Ендокринологія”.

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

За результатами дослідження опубліковано 5 статей у фахових наукових журналах, 1 патент на корисну модель і 7 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 Мерлавського В.М. пройшли апробацію на конференціях.

8. Структура дисертації.

Дисертаційна робота Мерлавського В.М. складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів дослідження з їх обговоренням, узагальнення, списку використаних літературних джерел. Робота викладена на 142 сторінках друкованого тексту, проілюстрована 53 рисунками. Список цитованих джерел включає 224 найменування.

Дисертація виконана державною мовою, якою автор володіє досконало. Стил 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, препаративних, фізико-хімічних, біохімічних, кінетичних досліджень та методи математичної статистики.

В огляді літератури надано логічний та структурований аналіз сучасних наукових публікацій із досліджуваної проблеми. Автор узагальнив існуючі відомості та показав перспективи подальших досліджень по вивченню взаємозв'язків між процесами клітинного сигналювання та метаболічними шляхами за різних функціональних станів організму.

У розділі «Матеріали та методи досліджень» описана загальна організація досліджень, використані методики дослідження, зокрема, моделювання тривалого впливу таурину, гіперінсулінемії, стрептозотоциніндукованого цукрового діабету, а також методики ізолювання гепатоцитів, полярографічного вимірювання швидкості дихання біологічних суспензій, дослідження дихання ізольованих інтактних і пермеабілізованих гепатоцитів, методи визначення активності ензимів. Описані також методи статистичної обробки експериментальних даних. 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 дослідженню дихання мітохондрій *in situ* пермеабілізованих гепатоцитів,

другий – з'ясуванню залежності інтенсивності дихання пермеабілізованих гепатоцитів від концентрації Ca^{2+} у середовищі, третій - впливу Ca^{2+} на кінетичні параметри окиснення субстратів циклу Кребса мітохондріями *in situ* гепатоцитів за тривалої дії таурину. Четвертий присвячений вивченню процесів дихання пермеабілізованих гепатоцитів за умов експериментальної гіперінсулінемії різної тривалості, п'ятий – з'ясуванню залежності процесів дихання гепатоцитів від концентрації Ca^{2+} у середовищі за умов стрептозотоциніндукованого діабету. Рівень викладення та аналізу матеріалу у цих розділах вказує на належну фахову підготовку дисертанта.

У розділі узагальнення результатів досліджень Мерлавський В.М. спираючись на літературні дані, обговорює можливі фізіологічні механізми отриманих результатів.

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

Даючи в цілому позитивну оцінку дисертаційному дослідженню Мерлавського В.М., хочу зазначити, що серйозних недоліків, які ставлять під сумнів одержані дисертантом основні висновки, дисертаційна робота не містить. але у ній є деякі моменти дискусійного характеру.

1. У дисертації не вказана кількість тварин, задіяних в експериментах. Чому в дослідженнях були використані лише самці щурів?
2. Також відсутня у роботі інформація про те, як здійснювали калібрування полярографа.
3. Незрозуміло, яким чином автор віддиференціював мітохондріальне дихання від мікросомального та ядерного.
4. На деяких рисунках показані лише невірогідні зміни показників дихання пермеабілізованих гепатоцитів за різних умов. На мій погляд, ці рисунки не потрібно було подавати у роботі. Достатньо того, що в тексті сказано про відсутність статистичної достовірності таких змін.
5. У висновку (стор. 87) автор вказує на те, що шестиденне введення інсуліну спричинило певні порушення толерантності до глюкози, що і може спричинити порушення чутливості до нього дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення ендогенних та екзогенних субстратів. Хотілося б почути більш чітко пояснення змін, що спостерігались. Тим паче, що швидкість дихання гепатоцитів за даних умов вірогідно не змінювалась.
6. У роботі показано, що введення інсуліну впродовж 12-ти діб не викликало статистично достовірних змін жодного із досліджуваних показників. Дисертант пояснює це тим, що «очевидно, за цей час у тварин виникають компенсаторні реакції за участю інших гормональних систем регуляції». Але не можна виключити й те, що інсулін, який використовували у даній серії дослідів, втратив свою активність.
7. Як у дисертаційній роботі, так і в авторефераті зрідка зустрічаються прикрі орфографічні помилки та не зовсім вдалі висловлювання. Так,

наприклад, слід пам'ятати, що речовини, які використовував дослідник вводять не «внутрішньоочередно», а «внутрішньоочередивно».

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

Висновок

Дисертаційна робота Мерлавського Володимира Михайловича «Ca²⁺-регуляція дихання гепатоцитів за різних функціональних станів організму», є завершеним, оригінальним, самостійним науковим дослідженням, що висвітлює актуальну тему і має вагомим 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 Мерлавського В.М., 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 – Мерлавський Володимир Михайлович 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

ПІДПИС ЗАСВІДЧУЮ
ВЧЕНИЙ СЕКРЕТАР
КАРАУЛЬНА Н.В.
44.03.2015р

