

ВІДГУК

Офіційного опонента на дисертацію Купиняк Надії Ігорівни на тему
**«РОЛЬ Ca^{2+} -ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ СИСТЕМ У РЕГУЛЯЦІЇ
ЕНЕРГЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ У МІТОХОНДРІЯХ КЛІТИН ПЕЧІНКИ»**,
що подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за
спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин

1. Актуальність теми

Дослідження ролі Ca^{2+} -сигналізації у процесах регуляції енергетичного забезпечення мітохондрій різних тканин є актуальним завданням сучасної фізіології. Особливо цікавими ці питання є у такому органі, як печінка. З одного боку, печінка – це класичний об'єкт для біоенергетики, а з іншого боку, печінка має широкий спектр функцій, включаючи певні етапи проміжного метаболізму, синтез і секрецію білків, транспорт і секрецію жовчних кислот і т.д. Крім того, саме у печінці шляхом окиснення відбувається знешкодження ксенобіотиків та токсичних речовин ендogenousного походження. Класичні дослідження з біоенергетики були проведені на ізольованих мітохондріях, тому дуже важливими є дослідження ролі різних Ca^{2+} -транспортувальних систем у регулюванні енергетичних процесів мітохондрій в цілих клітинах, в умовах коли мітохондрії знаходяться у нативному оточенні.

На сьогодні добре відомо, що концентрація Ca^{2+} у цитоплазмі гепатоцитів визначається Ca^{2+} -транспортувальними системами плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму. Але питання, які Ca^{2+} -транспортувальні системи залучені у регулювання енергетичних процесів у гепатоцитах і за яких умов, ще залишається не до кінця з'ясованим, незважаючи на велику кількість робіт. А оскільки дослідження ролі різних систем транспортування Ca^{2+} у енергетичних процесах гепатоцитів є важливим для розуміння широкого спектру фізіологічних та патофізіологічних процесів, актуальність даної роботи не викликає застережень.

2. Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, та їхня достовірність

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 були коректно використані адекватні поставленій меті і завданням дисертації методи:

Препаративні – отримання ізольованих мітохондрій методом диференціального центрифугування та гепатоцитів, методом двостадійної перфузії печінки.

Фізико-хімічні – полярографічне визначення змін напруження кисню у суспензії мітохондрій та ізольованих гепатоцитів; потенціометричне визначення мембранного потенціалу, яке було підтверджено з використанням потенціалзалежного барвника. Вміст іонізованого Ca^{2+} вимірювали флуоресцентним методом за допомогою спектрофлуориметра.

Біохімічні – для перевірки чистоти мітохондріальної фракції використовували метод визначення АТФазної активності, для визначення вмісту білка – метод Лоурі.

Статистичні – t-тест Стьюдента.

2. Об'єктивність результатів досліджень і висновків підтверджується фактичним матеріалом, який наведено у експериментальній частині роботи, та ґрунтовністю його аналізу. Суттєво полегшує сприймання фактичного матеріалу і проведення наукової експертизи велика кількість ілюстративного матеріалу – 31 рисунок та 3 таблиці.

3. Наукові положення, висновки та рекомендації повністю висвітлені у 6 статтях та 14 тезах доповідей на міжнародних та вітчизняних конференціях.

4. Основні положення дисертації біли успішно апробовані на 12 конференціях (Київ, 2012; 2013а; 2013б; 2014а; 2014б; 2015; Львів, 2014а; 2014б; Львів, 2015а; 2015б; Черкаси, 2012; Луцьк-Світязь, 2015), що підтверджує доцільність таких досліджень і значення отриманих результатів.

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

Результати аналізу фактичних даних, наведених у дисертації Купиняк Н.І., їхнього взаємозв'язку і причинно-наслідковості переконливо свідчать про те, що вони є достовірними, новими і пріоритетними.

Найбільш важливим досягненням цієї роботи є те, що вперше ідентифіковані мітохондріальні RyRs у гепатоцитах і показано їхній вплив на використання субстратів мітохондріями.

Хоча і решта результатів, безсумнівно є досить значимими:

1. Енергетичні процеси у гепатоцитах щурів не змінюються за інгібування Ca^{2+} -помпи еозином Y у концентрації 20 мкмоль/л за активації окиснення як ФАД-, так і НАД-залежних субстратів.

2. $\text{I}\Phi_3$ -чутливі Ca^{2+} -канали ендоплазматичного ретикулуму беруть участь у регуляції клітинного дихання за окиснення субстратів Ca^{2+} -залежних дегідрогеназ.

3. Мембранний потенціал мітохондрій внаслідок інгібування mRyRs виражено зменшується за $[\text{Ca}^{2+}]$ 0,1 мкмоль/л і окиснення пірувату (після 3 хв інкубації) чи α -кетоглутарату (після 5 хв), але не сукцинату. Таке зменшення мембранного потенціалу мітохондрій зумовлене пригніченням Ca^{2+} -залежних дегідрогеназ, активність яких регулюється катіонами Ca^{2+} .

4. Ефект інгібування mRyRs на дихання ізольованих мітохондрій залежить від $[\text{Ca}^{2+}]$ у середовищі та субстрату окиснення. За 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} у середовищі та окиснення пірувату швидкість АДФ-стимульованого дихання мітохондрій суттєво зменшується, а за 1 мкмоль/л – навпаки, збільшується. Збільшення АДФ-стимульованого дихання зареєстровано за і 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} та окиснення α -кетоглутарату. Коли ж окиснювався сукцинат, швидкість мітохондріального дихання під впливом ріанодину незначно зменшилася за обох концентрацій Ca^{2+} .

5. Ріанодин у концентраціях 0,05–1 мкмоль/л пригнічує, здебільшого, базальне дихання інтактних клітин внаслідок інгібування mRyRs. Ефекти інгібування RyRs ендоплазматичного ретикулуму інтактних гепатоцитів на мітохондріальне дихання є менш вираженіші, ніж ефекти інгібування mRyRs, і обмежені у часі, тому реєструються лише за безпосереднього внесення ріанодину в концентрації 1 мкмоль/л до клітин у полярографічну комірку.

6. Агоніст RyRs сурамін є агоністом і mRyRs. За окиснення субстратів Ca^{2+} -залежних дегідрогеназ (пірувату і α -кетоглутарату), у середовищі з 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} , він збільшує мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів, а за окиснення сукцинату – зменшує.

Отримані результати безсумнівно є важливими для розуміння ролі Ca^{2+} -залежної регуляції енергетичних процесів у мітохондріях клітин печінки за участі Ca^{2+} -транспортувальних систем плазматичної мембрани, ендоплазматичного ретикулуму та мітохондрій, і хочу наголосити знову, що досить важливим результатом роботи Купиняк Н.І. є визначення ролі мітохондріальних RYRs у цих процесах.

4. Запитання, зауваження та рекомендації до дисертації

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

1. Тема дисертації є занадто широкою як для кваліфікаційної роботи на здобуття наукового ступеня кандидата наук. Але це зауваження не стільки до дисертанта, а скоріше до наукового керівника та установи, де ця тема була затверджена.

2. Чому в якості блокатора Са-помпи використовували еозин Y, і чому його додавали саме у дозі 20 мкмоль/л?

3. Чому інгібування mRyRs найсуттєвішим є за окиснення пірувату? Про що це свідчить? Що в реальному житті визначає використання мітохондріями того чи іншого субстрату?

4. Яка доцільність порівняння ефектів ріанодину на дихання ізольованих мітохондрій та клітин печінки?

5. Які коливання цитозольної концентрації кальцію та як вони впливають на функцію ріанодин залежних кальцієвих каналів мітохондрій і окисні процеси в них?

6. Автор помилково називає ізольовані гепатоцити "інтактними". Після процесу виділення вони вже не є такими.

Однак ці питання та зауваження носять дискусійний характер і не зменшують цінності роботи.

5. Відповідність дисертації поставленим вимогам

Дисертаційне дослідження Купиняк Н.І. є завершеною наукою працею, в якій отримані нові науково-обґрунтовані результати, що визначають роль мітохондріальних RYRs у Ca^{2+} -залежному регулюванні енергетичних процесів у мітохондріях клітин печінки.

Оформлення дисертації відповідає вимогам МОН України. Науковий зміст автореферату відповідає змісту дисертації.

7. Практичне значення дисертаційної роботи

Інтерпретація отриманих результатів дає можливість поглибити та розширити знання про механізми Ca^{2+} -залежної регуляції мітохондріального

дихання гепатоцитів. Отримані дані можуть бути корисними для подальшого пошуку шляхів запобігання набутих патологій та способів модуляції функціональної активності Ca^{2+} -транспортувальних систем клітин печінки. Ідентифікація мітохондріальних ріанодинових рецепторів має важливе значення не лише для фізіології людини і тварин, але й для фармакології

Важливо, що деякі положення дисертаційної роботи КУпиняк Н.І. є впровадженими у навчальний процес і використовуються у Львівському національному університеті імені Івана Франка при викладанні загального курсу «Фізіологія людини і тварин» та спецкурсів «Фізіологія травлення» і «Біоенергетика».

8. Висновок

Кандидатська дисертацій Купиняк Н.І. є актуальним, завершеним фундаментальним дослідженням в галузі фізіології людини і тварин. При виконанні цієї роботи дисертантом із використанням адекватних методів були отримані нові оригінальні і вагомні результати щодо ролі мітохондріальних RYRs у Ca^{2+} -залежному регулюванні енергетичних процесів у мітохондріях клітин печінки.

Отже, дисертаційна робота цілком відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», які висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор Купиняк Н.І. заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Офіційний опонент,
доктор медичних наук, професор,
член-кореспондент НАН України

Сагач В.М.

