

Відгук

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Купиняк Надії Ігорівни

«Роль Ca^{2+} -транспортувальних систем у регуляції енергетичних процесів у мітохондріях клітин печінки»,

що подана до захисту у спеціалізовану вчену раду К 35.051.14

при Львівському національному університеті імені Івана Франка на здобуття наукового ступеня доктора філософії (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 на них здійснюють іони Ca^{2+} . 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 кожної з Ca^{2+} -транспортувальних систем у регуляції дихання мітохондрій у гепатоцитах. Зокрема, за умов збереження морфофункціональних зв'язків між їхніми органелами, що є важливим з огляду на тісний контакт мітохондрій з ендоплазматичним ретикуломом та комплексом Гольджі, а також у зв'язку з тим, що окисне фосфорилування регулюється сусідніми органелами завдяки зміні концентрації Ca^{2+} у цитозолі та споживання АТФ.

Системи $\text{I}\Phi_3$ -чутливих та ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів ендоплазматичного ретикулуму є одними з головних у забезпеченні генерування Ca^{2+} -сигналів у відповідь на гормональні впливи. Однак, їх функції як регуляторів енергетичних процесів, як і, взагалі, наявність ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів саме у мітохондріях клітин печінки є досі не з'ясованими.

Тому дослідження особливостей функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем гепатоцитів у площині їх впливу на енергетичні процеси мітохондрій 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: “ Ca^{2+} -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), а також за часткової підтримки Західно-Українського біомедичного центру (WUBMRC) і Товариства прихильників Львівського національного університету імені Івана Франка.

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 Купиняк Н.І. є оригінальною науковою працею, яка виконана на належних методичному і теоретичному рівнях. Робота має послідовну та логічну структуру і є комплексним та завершеним науковим дослідженням. Зміст роботи і багатогранність висвітленої проблеми свідчать про високий рівень наукової компетентності автора.

Викладене вище свідчить про обґрунтованість наукових положень і висновків, що викладені у дисертаційній роботі Купиняк Н.І.

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

Сформульовані Купиняк Н.І. 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 Купиняк Н.І. як достовірні.

Дослідження проведені на білих щурах з дотриманням законів України, 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 Купиняк Н.І. 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 ідентифіковано мітохондріальні ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали у гепатоцитах щура і вперше проведено комплексне дослідження їхньої ролі у регуляції функціональної активності мітохондрій цих клітин. Виявлено, що мітохондріальні ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали інгібуються ріанодином у концентраціях 0,05–1 мкмоль/л, що супроводжується зменшенням акумуляції Ca^{2+} у матриксі мітохондрій. Внаслідок цього мембранний потенціал мітохондрій зменшується за $[\text{Ca}^{2+}]$ у середовищі 0,1 мкмоль/л та окиснення

пірувату чи α -кетоглутарату, але не сукцинату. Встановлено, що вплив інгібування мітохондріальних ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів на дихання ізольованих мітохондрій залежить від концентрації Ca^{2+} у середовищі, субстрату окиснення та часу його дії. Досліджено, що ріанодин у концентраціях 0,05–1 мкмоль/л пригнічує базальне дихання інтактних гепатоцитів внаслідок інгібування мітохондріальних ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів. Виявлено, що вплив інгібування ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів ендоплазматичного ретикулуму інтактних гепатоцитів на мітохондріальне дихання є менш вираженим, ніж ефекти інгібування мітохондріальних ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів, і є обмеженим у часі. Встановлено, що агоніст ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів ендоплазматичного ретикулуму сурамін є агоністом і мітохондріальних ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів гепатоцитів. За окиснення субстратів Ca^{2+} -залежних дегідрогеназ (пірувату і α -кетоглутарату) і 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} у середовищі він збільшує мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів, а за окиснення сукцинату – навпаки, зменшує.

6. *Практичне значення одержаних результатів.*

Одержані Купиняк Н.І. результати поглиблюють знання про закономірності енергетичних процесів у клітинах печінки та їх взаємозв'язок із Ca^{2+} -сигналюванням. Отримані дані можуть бути корисними для пошуку шляхів запобігання набутим патологіям та способів впливу на функціональну активність Ca^{2+} -транспортувальних систем клітин печінки.

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

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

За результатами дослідження опубліковано 6 статей у фахових наукових журналах і 14 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних конференціях. Публікації й 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 Купиняк Н.І. пройшли апробацію на конференціях.

8. *Структура дисертації.*

Дисертаційна робота Купиняк Н.І. складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів дослідження з їх обговоренням, узагальнення, списку використаних літературних джерел.

Робота викладена на 141 сторінці друкованого тексту, проілюстрована 31 рисунком, містить 3 таблиці. Список цитованих джерел включає 241 найменування.

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, препаративних, фізико-хімічних, біохімічних, біофізичних 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 енергозабезпечення та Ca^{2+} -сигналюванням.

У розділі «Матеріали та методи досліджень» описана загальна організація досліджень, використані методики дослідження, зокрема, ізолювання як гепатоцитів, так і мітохондрій, полярографічного вимірювання швидкості дихання біологічних суспензій, дослідження дихання ізолюваних інтактних і пермеабілізованих гепатоцитів, методи визначення мембранного потенціалу мітохондрій. 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 ролі Ca^{2+} -помп плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму у регуляції енергетичного забезпечення гепатоцитів, другий – з'ясуванню впливу $\text{I}\Phi_3$ на енергетичні процеси у пермеабілізованих клітинах печінки, третій – ідентифікації р'анодинчутливих Ca^{2+} -каналів мітохондрій гепатоцитів. Четвертий присвячений з'ясуванню ролі mRyRs у регуляції мітохондріального дихання, п'ятий – вивченню енергетичних процесів у печінці щура за дії р'анодину, шостий – дослідженню впливу сураміну на зміни мембранного потенціалу ізолюваних мітохондрій. Рівень викладення та аналізу матеріалу у цих розділах вказує на належну фахову підготовку дисертанта.

У розділі узагальнення результатів досліджень Купиняк Н.І. 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 Купиняк Н.І., 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 загальна 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. Для дослідження особливостей функціонування мітохондріальних ріанодинчутливих Ca^{2+} -каналів дисертант використала ріанодин у концентрації від 0,05 до 1 мкмоль/л. Чим зумовлений вибір саме такого діапазону концентрацій агоніста?
4. Невисвітленим залишилось питання, якою є доцільність участі $\text{I}\Phi_3$ -чутливих Ca^{2+} -каналів ендоплазматичного ретикулуму в регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів?
5. Цікавим також є те, чому за різних концентрацій Ca^{2+} зміни швидкості АДФ-стимульованого дихання за окиснення пірувату є протилежно спрямованими?
6. У авторефераті підпис до рисунка, на якому зображено узагальнюючу схему Ca^{2+} -залежної регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів не містить розшифрувань позначень, використаних на самій схемі.
7. Як у дисертаційній роботі, так і в авторефераті зрідка зустрічаються прикрі орфографічні, граматичні, стилістичні помилки та не зовсім вдалі висловлювання чи звороти. Так, наприклад на стор. 8, 60, 72, 92, 93, 94, 113 вжито словосполучення “гепатоцити печінки”, що за своєю суттю є тавтологією. Також на стор. 49 використано жаргоністичний вислів “показники екстинкції реєстрували на ФЕКу”. Декілька разів у роботі трапляється словосполучення “концентрація білка” (стор. 4, 8, 49), хоча, насправді, йдеться про його вміст. Незрозумілим також є формулювання “В основу вирахування покладено здатність білкових молекул вираховувати реактив Фоліна” (стор. 49). Інколи автор застосовує вислів “збільшення дихання” (наприклад, на стор. 9, 113), хоча більш доцільним є “збільшення швидкості дихання”. Крім того, треба пам'ятати, що слово присутність вживається лише стосовно людей, а щодо хімічних сполук чи іонів треба застосовувати наявність (стор. 15, 63, 71).

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

Висновок

Дисертаційна робота Купиняк Надії Ігорівни “Ca²⁺-регуляція дихання гепатоцитів за різних функціональних станів організму” 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 Купиняк Н.І., автореферату дисертації, публікацій дисертанта у фахових наукових виданнях можна зробити висновок, що дисертаційна робота виконана на належному теоретичному і методичному рівнях, відповідає вимогам щодо дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, а автор дисертації – Купиняк Надія Ігорівна 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 та медицини”
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка,
професор кафедри фізіології та анатомії

 П.І. Янчук

Підпис проф. Янчука П.І. засвідчую:

Вчений секретар НДЧ
Київського національного
університету імені Тараса Шевченка

Підпис засвідчую
Вчений секретар НДЧ
Караульна Н.В.
06.12.2011

Н.В. Караульна



