

# **ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА**

**доктора біологічних наук, професора, завідувача кафедри біофізики  
та медичної інформатики ННЦ «Інститут біології та медицини»  
Київського національного університету імені Тараса Шевченка  
Жолоса Олександра Вікторовича**

**про науково-практичну цінність дисертаційної роботи**

**Мазур Галини Михайлівни**

***«ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ КРИТЕРІЇВ  
АДАПТАЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ МІТОХОНДРІЙ ГЕПАТОЦИТІВ  
ЩУРІВ»***

**представлену на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних  
наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика**

## **Актуальність проведених досліджень**

Мітохондрії продукують до 90% від усієї кількості клітинного АТФ, основного енергетичного ресурсу організму людини і тварин. Мітохондрії є дуже чутливими до стресових факторів оточуваного клітинного середовища. Вони є, з одного боку, важливими мішенями для негативних стресорних факторів, а з іншого боку – свого роду координаційними центрами для адаптивної відповіді клітини на стрес. Дисфункція мітохондрій призводить до зниження рівня продукції АТФ, а також може призвести до оксидативного ушкодження біологічних макромолекул різних класів у разі, якщо генерація реактивних форм кисню перевищить компенсаційні можливості систем антиоксидантного захисту клітин.

Дисфункція мітохондрій є однією з основних причин патологічних станів, які пов'язані з гіпоксією, ішемічно-реперфузійним ушкодженням клітин, а також при дії різних токсичних речовин. Хоча вся складність

мітохондріальної біоенергетики та роль мітохондрій у складних мережах клітинної сигналізації ще не повністю вивчені, наразі вже очевидно, що забезпечення функціонування мітохондрій у нормальному стані є центральним компонентом підтримання гомеостазу клітин та їх адекватних адаптаційних властивостей.

Таким чином, дисертаційне дослідження Мазур Г.М., яке було спрямоване на пошук та обґрунтування критеріїв адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів, загалом відповідає найбільш сучасним науковим трендам у цій галузі біомедичних наук, і його можна вважати цілком актуальним.

### **Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне та практичне значення**

Автором дисертаційного дослідження було отримано цілий ряд нових даних, або ж таких, які суттєво уточнюють існуючі уявлення щодо критеріїв адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів щурів, серед яких на особливу увагу заслуговують наступні:

- показано, що для повноцінної оцінки адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів потрібно застосовувати комплекс критеріїв, зокрема це максимальна швидкість роз'єданого дихання, оптимальна концентрація FCCP, прискорення дихання внаслідок додавання FCCP та площа приросту під кривими залежності швидкості дихання від концентрації FCCP;
- вперше було показано, що субстрати окиснення суттєво і різним чином впливають на адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів, при цьому мітохондрії проявляють найнижчу адаптаційну здатність під час окиснення глюкози, а найвищу - за окиснення сукцинату та  $\alpha$ -кетоглутарату;

- з суто методичної точки зору на певну увагу заслуговує і той факт, що адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів певним чином залежить від способу виділення клітин. У той же час незалежно від способу перфузії швидкість роз'єданого дихання може досягати максимальних значень за використання монометил-сукцинату, а оптимальна концентрація FCCP досягається за окиснення пірувату;
- детально досліджена роль іонів кальцію у регуляції адаптаційної здатності мітохондрій, зокрема авторкою були отримані такі нові дані: 1) зменшення адаптаційної здатності мітохондрій спостерігається при збільшенні концентрації іонів кальцію до 10 мкмоль/л, і цей ефект не залежить від типу субстрату; 2) при збільшенні концентрації іонів кальцію прискорювались процеси пригнічення АДФ-стимульованого дихання; 3) циклоспорин А запобігав розвитку кальцій-залежного пригнічення АДФ-стимульованого і FCCP-стимульованого дихання у субстрат-специфічний спосіб.

Останнє положення дисертаційної роботи можна вважати одним з найбільш важливих нових наукових результатів цього дослідження, що має не тільки теоретичну, а і практичну цінність, адже в деяких експериментальних моделях циклоспорин А як інгібітор СуР (родина РРІаз) запобігає апоптозу клітин у наслідок транзійтної ішемії. Цей ефект пов'язують з блокуванням формування мітохондріальних пор перехідної проникності (РТР) на внутрішній мембрані мітохондрій шляхом інгібування циклофілінів СуР-D. Таким чином, отримані результати розширюють наші уявлення щодо механізмів ушкодження клітин у контексті кальцій-залежної регуляції адаптаційної здатності мітохондрій.

У підсумку, можна вважати, що запропоновані авторкою нові критерії адаптаційної здатності мітохондрій є доцільними і корисними для дослідження мітохондрій клітин печінки за фізіологічних та патологічних умов.

### **Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи**

Наукові положення дисертаційної роботи базуються на застосуванні адекватних поставлених меті і завданням роботи прямих біофізичних та фізико-хімічних методів оцінки функцій мітохондрій (дослідження параметрів дихання ізольованих та пермеабілізованих гепатоцитів, полярографічний і спектрофотометричний методи, флуоресцентна мікроскопія) у поєднанні з комплексом інших методів, а саме фізіологічних (моделювання станів короткотривалим хронічним введенням етанолу та піривату *in vivo*) та статистичних (порівняльний і дисперсійний аналіз).

Висновки по кожній серії проведених експериментів базуються на достатній кількості вимірів, їх адекватному статистичному аналізу і порівнянням з літературними даними.

Загалом Мазур Г.М. показала себе компетентним науковцем, вона є добре обізнаною з науковою літературою по досліджуваній проблематиці і здатною до фахового і критичного аналізу отриманих нею результатів.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційну роботу виконано згідно з планами науково-дослідних робіт кафедри фізіології людини і тварин біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка у межах державних бюджетних тем «Ca<sup>2+</sup>-транспортувальні системи та регуляції клітинного дихання екзокринних залоз у нормі і за дії стресорних

чинників» (2015–2017 рр., № держреєстрації 0115U003246) і «Адаптаційний потенціал мітохондрій секреторних клітин підшлункової залози і печінки у нормі та за розвитку патології» (2018–2020 рр., № держреєстрації 0118U003604).

### **Структура і обсяг дисертації, оцінка її завершеності та відповідності встановленим вимогам**

Дисертаційна робота Мазур Г.М. побудована за загально-прийнятою формою у відповідності до вимог МОН України. Роботу викладено на 131 сторінках, що включає в себе анотацію, список наукових праць по темі дослідження, вступ, огляд літератури, опис матеріалів та методів досліджень, опис та ілюстрації результатів досліджень разом з їх обговоренням, узагальнення, висновки та список цитованої літератури (139 джерел). Отримані результати проілюстровані 32 рисунками, які дають повне уявлення про значний об'єм та високу якість проведених досліджень. У розділі «Узагальнення» наведена підсумкова схема, що ілюструє взаємозв'язків між адаптаційною здатністю мітохондрій гепатоцитів та різними факторами, які на неї впливають і які були предметом даного дослідження.

У вступі наведена інформація щодо важливості адаптаційної здатності мітохондрій як компоненту їх біоенергетичного потенціалу, який залучається під час зростання енергетичних потреб клітини. При цьому підкреслюється практичне значення роботи, адже зниження цього потенціалу мітохондрій пов'язане з апоптозом клітин, який у свою чергу є однією з причин серцево-судинних, нейродегенеративних та ракових захворювань, тобто одних з найбільш поширених захворювань людини.

На цій основі формується загальна мета дослідження та ряд конкретних завдань на шляху до її досягнення.

Далі Мазур Г.М. пояснює зв'язок її роботи з науковими програмами Львівського національного університету імені Івана Франка, де вона виконувалася, зазначає наукову новизну, теоретичне та практичне значення отриманих результатів, а також надає відомості щодо особистого внеску здобувача, апробації матеріалів дисертаційного дослідження та публікацій по темі дослідження.

Розділі 1 (Огляд літератури) містить описи циклу трикарбонових кислот (у тому числі аналізується транспортування субстратів циклу трикарбонових кислот), процесів мітохондріального дихання у печінці, дихального ланцюга мітохондрій. Окремо і досить детально аналізуються дані літератури стосовно ролі  $\text{Ca}^{2+}$  у регуляції клітинного дихання, а також біохімічних процесів окиснення етанолу і його токсичних ефектів.

Всі ці питання безпосередньо стосуються проблематики даного дослідження, таким чином цей розділ повністю відповідає основним напрямкам дослідження.

В розділі 2 (Матеріали і методи дослідження) деталізуються процедури, що стосуються роботи з експериментальними тваринами, методика дослідження дихання цілісних та пермеабілізованих гепатоцитів, методика полярографічного вимірювання швидкості споживання кисню ізольованими гепатоцитами, спектрофотометричний метод визначення розвитку лактат-ацидозу, метод визначення мембранного потенціалу та НАДН-автофлуоресценції мітохондрій гепатоцитів.

Розділ 3 (Результати досліджень та їхнє обговорення) складається з 5 підрозділів, в яких наведені основні результати досліджень. Ця частина роботи структурована у логічній послідовності.

У першому підрозділі наведені дані щодо дослідження адаптаційної здатності мітохондрій інтактних гепатоцитів під час окиснення різних субстратів циклу трикарбонових кислот. Далі Мазур Г.М. переходить до

вирішення питань стосовно залежності адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів від способу виділення клітин, процесів дихання та окисного фосфорилування пермеабілізованих гепатоцитів за спричиненої  $\text{Ca}^{2+}$  активації мітохондріальної РТР. З практичної точки зору слід відзначити останні два підрозділи, які стосуються питань впливу етанолу на дихання гепатоцитів за окиснення глюкози, пірувату чи монометил-сукцинату, а також можливого порушення адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів щурів за тривалого введення алкоголю на тлі високо-жирової дієти.

Кожен з цих підрозділів містить підсумок, що сприяє кращому розумінню взаємозв'язків між ними.

В розділі 4 отримані результати обговорюються у порівнянні з попередніми дослідженнями цієї проблематики, робляться підсумки, наводиться загальна схема взаємозв'язків між адаптаційною здатністю мітохондрій гепатоцитів та різними факторами, які на неї впливають відповідно до цього дослідження. Висновки роботи загалом відповідають поставленим завданням і повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

Автореферат дисертаційної роботи відповідає її змісту та адекватно ілюструє її основні результати.

Представлені у дисертаційній роботі результати опубліковані у 12 статтях та тезах конференцій. Результати доповідались на фахових наукових симпозиумах, серед яких варто відмітити 7-й з'їзд Українського біофізичного товариства, а також 3<sup>rd</sup> Kyiv International Symposium Smooth Muscles Physiology, Biophysics & Pharmacology: from genes and molecules to functions, disorders and their novel treatment opportunities. Ці фахові форуми міжнародного рівня відповідають спеціальності 03.00.02 – біофізика.

Під час рецензування даної дисертаційної роботи виникли наступні запитання та зауваження:

1. Вміст кисню в розчинах зазначається наномолях - як це корелює з парціальним тиском  $pO_2$ , що є більш широко використовуваним параметром, зокрема у клінічній практиці?
2. Яким чином калібрували сигнал від рН-чутливий зонду фенолового червоного?
3. На рис. 2.2, 2.3, 3.21, 3.23 варто було б навести калібровки для оцінки розмірів клітин.
4. На рис. 3.4 варто було б пояснити символи різного кольору, тобто що саме означає кожен з них. Наприклад рис. 3.4А (2) позначено як глутамін, але на графіку є червоний кружок і жовтий трикутник. Чи означають вони результати двох окремих вимірів? Якщо так, то у чому полягала різниця між ними?
5. Олігоміцин у мікромольній концентрації, як це використовувалось у цій роботі, також пригнічує  $Na^+ - K^+ - ATФазу$  плазматичної мембрани. Чи враховували можливість такого ефекту?
6. Шкідлива дія етанолу на гепатоцити є загальновідомою. Чи не вбачає авторка певного суперечності у положеннях дисертації стосовно відсутності впливу етанолу на адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів *in vitro*, тоді як *in vivo* етанол навіть підвищував адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів?
7. Є деякі зауваження щодо термінології:
  - гладкі м'язи – краще гладенькі м'язи;
  - смерть клітин – краще використати стандартний термін «апоптоз».

Висловлені зауваження суттєво не впливають на мою загалом дуже високу оцінку даної дисертаційної роботи.



**Висновок:**

Згідно з пунктами 9, 11, 12, 13 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 р. (зі змінами), вважаю, що за своєю актуальністю, науковою новизною, високим методичним рівнем, теоретичною та практичною значністю, об'ємом проведених досліджень, обґрунтованістю та достовірністю зроблених узагальнень і висновків, а також перспективами наукового і практичного застосування дисертаційна робота Мазур Галини Михайлівни «Експериментальне обґрунтування критеріїв адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів щурів» відповідає всім вимогам до дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент  
завідувач кафедри біофізики та медичної інформатики  
ННЦ "Інститут біології та медицини"  
Київського національного університету  
імені Тараса Шевченка,  
доктор біологічних наук, професор Жолос О.В.



Підпис О.В. Жолоса засвідчую

Заступник директора ННЦ "Інститут біології та медицини"

з наукової роботи,

д.б.н.



Сокур Л.В.