

До разової спеціалізованої ради ДФ 35.051.131
Львівського національного університету
імені Івана Франка
м. Львів, вул. Університетська, 1

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу Зуб Анастасії Миколаївни
за темою: “Вплив амінокислот на енергетичне забезпечення ацинарних клітин
підшлункової залози”, яка представлена на здобуття ступеня доктора філософії
з галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія

Актуальність теми дисертації

Незважаючи на вагомі досягнення у вивченні різних аспектів гострого панкреатиту, питання діагностики, прогнозування перебігу та лікування цього захворювання не втрачають медичного та соціального значення. У 15-25 % випадків перебіг гострого панкреатиту супроводжується розвитком панкреонекрозу, летальність при різних формах якого коливається від 24 % до 92 %. Це зумовлює актуальність досліджень, спрямованих на вивчення особливостей механізмів розвитку та прогресування гострого панкреатиту, що сприятиме розробці нових ефективних способів діагностики та прогнозування, патогенетично обґрунтованих методів комплексного лікування і профілактики ускладнень.

Раннє ентеральне або парентеральне харчування може допомогти зменшити мультисистемну органну недостатність, ускладнення панкреатичної інфекції та смертність. Окремі амінокислоти можуть бути використаними як джерело необхідної енергії та метаболітів ацинарними клітинами підшлункової залози для полегшення гострого панкреатиту. Проте механізми впливу амінокислот на ацинарні клітини підшлункової залози є недостатньо вивченими.

Вважаю, що робота є актуальною і спрямованою на вирішення важливої проблеми, а саме, з'ясування механізмів впливу амінокислот на біоенергетичні процеси в ацинарних клітинах підшлункової залози за гострого панкреатиту.

Зв'язок дисертаційної роботи з державними чи галузевими науковими програмами

Дисертаційна робота виконана на кафедрі фізіології людини і тварин біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка в рамках держбюджетних тем «Ca²⁺-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), «Функціональна оцінка мітохондрій: пайплайн для виявлення механізмів передпатологічних станів травних залоз» (2023–2025 рр., № держреєстрації 0123U101951), а також теми, що виконувалася у межах робочого часу викладачів «Транскрипційна і функціональна адаптація мітохондрій підшлункової залози та печінки до дієтарних чинників» (2021–2023 рр., № держреєстрації 0123U110302). Дисертантка була виконавцем цих тем.

Ступінь обґрунтованості та достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій, сформованих у дисертації

Дисертанткою чітко сформульовано мету та окреслено основні завдання роботи для досягнення цієї мети. Усі експериментальні результати, наукові положення і висновки дисертаційної роботи побудовані на матеріалах власних досліджень. Результати отримані за допомогою сучасних взаємодоповнюючих методів досліджень, є науково обґрунтованими та достовірними.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснено за допомогою програми Microsoft Office Excel та забезпечення OriginPro 2018. Статистичну достовірність різниці між контрольними та дослідними групами визначали за допомогою двофакторного аналізу ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні, у разі значної взаємодії між факторами або в межах одного фактора з більш ніж двома рівнями, коли взаємодія не була доведена.

Основні наукові результати, одержані автором, та їхня новизна

Новизна отриманих дисертанткою основних наукових результатів:

- уперше показано вплив амінокислот на енергетичне забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози; встановлено, що швидкість роз'єданого дихання підвищується за окиснення глутамату, глутаміну, аланіну, лізину та аспартату; показано, що аспарагін, аргінін і гістидин не вступають у процеси мітохондріального дихання незалежно від наявності альтернативних субстратів окиснення.

- уперше встановлено, що глутамін у концентрації 2 ммоль/л за стимуляції холецистокініном зменшує швидкість роз'єданого окиснення, але не впливає на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози; встановлено,

що в процесі окиснення глутаміну (2 ммоль/л) не утворюється токсична кількість аміаку, як у нормі, так і за стимуляції ацинарних клітин підшлункової залози секреторними агентами;

- показано негативний вплив глутаміну у високій концентрації (20 ммоль/л) на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози за довготривалої інкубації; зареєстровано збільшення площі клітин та інтенсифікацію мембранного блебінгу за впливу глутаміну; встановлено, що глутамінова кислота, аспарагін і аспартат дещо збільшують кількість некротичних клітин, лізин і аргінін зумовлюють загибель усіх клітин у середовищі інкубації, тоді як аланін та гістидин не впливають на життєздатність панкреатичних ацинусів;

- уперше встановлено, що натрію піруват нормалізує рівень амінокислот у плазмі крові, але не впливає на морфологічну структуру підшлункової залози у щурів з гострим панкреатитом;

- розроблено схему участі амінокислот у метаболізмі ацинарних клітинах підшлункової залози.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів дослідження

Варто зазначити, що проведені Анастасією Миколаївною експериментальні дослідження впливу амінокислот на енергетичні процеси та життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози створюють базове наукове підґрунтя для аналізу впливу вибраних амінокислот на підшлункову залозу за різних фізіологічних і патологічних станів.

Експериментально доведено збільшення швидкості дихання панкреатичних ацинусів без зміни життєздатності клітин за впливу аланіну. Крім цього, показано негативний ефект глутаміну у високій концентрації на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози.

Одержані результати є важливими не лише для розуміння ролі амінокислот у функціонуванні клітин підшлункової залози, а й для передбачення ефекту інших енергетичних субстратів.

Результати досліджень можуть бути використані у біології та медицині для розробки засобів запобігання гострого панкреатиту чи для модуляції функціонування панкреатичних ацинусів за різних фізіологічних станів.

Отримані результати дисертаційного дослідження можуть бути впроваджені в навчальний процес під час викладання спецкурсів на кафедрі фізіології людини і тварин біологічного факультету Львівського національного

університету імені Івана Франка. Апробовані методики досліджень можуть використовувати студенти, аспіранти та наукові співробітники у наукових дослідженнях.

Апробація результатів дисертації, повнота викладу основних положень, висновків і рекомендацій

У роботі наведено 4 висновки, які чітко узгоджуються зі сформульованими завданнями дисертаційної роботи й отриманими результатами. Основні наукові результати та висновки дисертації апробовано на міжнародних і всеукраїнських конференціях в період з 2019 по 2023 рр., а також були перевірені під час рецензування публікацій у фахових виданнях.

За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 3 статті (2 статті у міжнародних виданнях віднесені до другого квартилю (Q2) і 1 статтю в українському фаховому журналі):

- дві статті у 2021 р.: одна з яких в українському фаховому журналі *Visnyk of Lviv University. Biological Series*, та одна в журналі *Panaceas*, що належить до другого (Q2) квартиля відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank;

- одну статтю у 2023 р. у журналі *Amino Acids*, що належить до другого (Q2) квартиля відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank,

Сукупність усіх публікацій відображає викладені в дисертації результати дослідження, що відповідає вимогам п. 8, 9 вимог до присудження ступеня доктора філософії “Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії”, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44.

Відомості про дотримання академічної доброчесності

У наукових публікаціях і дисертаційній роботі Зуб Анастасії Миколаївни на тему “Вплив амінокислот на енергетичне забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози” не виявлено ознак академічного плагіату, фальсифікації чи інших порушень, що могли б поставити під сумнів самостійний характер виконання дисертанткою представленого наукового дослідження. Текст є оригінальним, всі цитати коректно позначені та вказані в списку використаних джерел.

Структура та зміст дисертації. Дисертаційна робота відповідає вимогам щодо оформлення дисертацій, затвердженим наказом Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. № 40.

Дисертацію викладено на 146 сторінках українською мовою, основна частина становить 94 сторінки, проілюстрована 27 рисунками та 2 таблицями. Робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів власних досліджень, узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел і додатків. Рукопис містить список цитованої літератури, до якого входять 210 найменувань.

Дисертаційна робота розпочинається з анотації та ключових слів, які написані державною та англійською мовами, списку публікацій здобувача за темою дисертації, переліку умовних скорочень і змісту роботи. В анотації стисло представлені основні результати дослідження із зазначенням наукової новизни і практичного значення.

У **“Вступі”** (с. 18–22) обґрунтовано актуальність обраної теми, відображено зв'язок роботи з науково-дослідною темою кафедри фізіології людини і тварин, сформульовано мету та завдання дослідження, наведено об'єкт, предмет та методи досліджень, визначено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів, описано особистий внесок здобувача, представлено апробацію результатів дисертації та публікації, а також наведено коротку інформацію про структуру й обсяг дисертації.

У першому розділі дисертаційної роботи **“Огляд літератури”** (с. 23–39) проаналізовано наукову літературу, в якій охарактеризовано екзокринну функцію підшлункової залози, процеси мітохондріального дихання і значення мітохондрій для панкреатичних ацинусів. Автором роботи детально проаналізовано роль амінокислот у функціонуванні підшлункової залози, зокрема наведено дані про метаболізм, транспорт і біологічні ефекти амінокислот. Проведений аналіз літературних джерел дав змогу здобувачці зробити висновок про пріоритетність обраного напрямку наукової роботи.

У другому розділі **“Матеріали та методи дослідження”** (с. 40–49) детально описано умови утримання та основні засади поводження з лабораторними тваринами. Представлено узагальнюючу схему дослідження з використанням експериментальної моделі гострого L-аргінін-індукованого панкреатиту для вивчення дії натрію пірувату. Наведено методику ізолювання панкреатичних ацинусів. Описано склад використаних розчинів. Наведено методику полярографічного вимірювання швидкості споживання кисню за впливу амінокислот або інших речовин. Представлено схему розрахунку

кінетичних параметрів дихання. Описано методики флюоресцентної мікроскопії, ізолювання ДНК, кількісної оцінки фрагментації ДНК і електрофорезу. Наведено методику хроматографічного аналізу вмісту амінокислот, гістології та електронної мікроскопії. Представлено методику оцінки активності амілази. Також описано статистичну обробку результатів із використанням програмного забезпечення Microsoft Office Excel та OriginPro 2018. Представлена інформація про етапи, об'єкти, методи та обсяг досліджень чітко відповідає меті та завданням дисертації.

У третьому розділі **“Результати досліджень та їхнє обговорення”** (с. 50–103) відображено результати дослідження дії амінокислот на дихання панкреатичних ацинусів *in vitro*. Досліджено ефект глутаміну на ацинарні клітини за стимуляції секреторними агентами, а також проведено порівняльний аналіз впливу глутаміну та аміаку на дихання панкреатичних ацинусів *in vitro*. Описано зміни життєздатності панкреатичних ацинусів за впливу амінокислот у високій концентрації за умов короткотривалої і довготривалої інкубації. Оцінено кількість некротичних і апоптичних клітин, зміну площі ацинарних клітин і блебінг плазматичної мембрани. У цьому розділі детально описано експериментальне дослідження впливу натрій пірувату на L-аргінін-індукований гострий панкреатит у щурів *in vivo*. Оцінено морфологію та ультраструктуру підшлункової залози, а також рівень амінокислот у плазмі крові за дії натрій пірувату.

Отримані результати досліджень висвітлено у двадцяти трьох рисунках і одній таблиці.

У четвертому розділі **“Узагальнення”** (с. 104–111) дисертантка аналізує отримані результати, даючи ґрунтовні наукові відповіді на ряд ключових питань своєї роботи. Зокрема, чому різні амінокислоти мають різний ефект на швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози? Які можливі механізми окиснення амінокислот у мітохондріях панкреатичних ацинусів? Чи пов'язана здатність амінокислот вступати у процеси окиснення з впливом на життєздатність ацинарних клітин? Чому глутамін у високій концентрації є токсичним для панкреатичних ацинусів? Який механізм нормалізації рівня амінокислот у плазмі крові тварин з гострим панкреатитом за дії натрію пірувату *in vivo*? У цьому розділі дисертанткою подано аналіз отриманих даних у вигляді підсумкової схеми, яка відображає механізм метаболічних шляхів амінокислот у ацинарних клітинах підшлункової залози.

Висновки (с. 112–113): сформульовано чотири висновки, які логічно впливають з одержаних результатів, науково обґрунтовані, відповідають меті та завданням дослідження.

Список використаних джерел (с. 114–140) оформлено за встановленим стандартом та сформовано в порядку їх згадування в роботі.

Рукопис завершується додатками А і Б. Додаток А містить список публікацій здобувачки за темою дисертації. Перелік наукових праць, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації – 3 статті; праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації – 7 тез доповідей на міжнародних і всеукраїнських конференціях. Okремо наведено відомості про апробацію результатів дисертації.

Додаток Б містить зображення ацинарних клітин за впливу амінокислот у високій концентрації.

Зауваження до дисертації. Подана дисертаційна робота вказує на наукову зрілість дисертантки, її вміння бачити актуальні проблеми біології. Загалом, дисертаційна робота Зуб А. М. за своїм змістом і формою є завершеним самостійним науковим дослідженням. Високо оцінюючи наукове і практичне значення дисертаційної роботи, висловлюю деякі зауваження та побажання:

1. У розділі “Матеріали і методи” досліджень варто описати умови створення моделі L-агринін-індукованого гострого панкреатиту.
2. Незрозумілим є механізм розвитку гострого панкреатиту за впливу L-агриніну.
3. Варто обґрунтувати вибір дози та схему введення та пірувату натрію.
4. Замість “флуоресцентна мікроскопія” слід використовувати “флюоресцентна...”.
5. Також незрозумілим є відновлення рівня незамінних амінокислот за впливу пірувату.

Однак, вищенаведені зауваження істотно не впливають на науково-практичну цінність роботи і загальну позитивну оцінку дисертації.

Висновки про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Зуб Анастасії Миколаївни на тему “Вплив амінокислот на енергетичне забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози” є завершеною науковою працею. Вважаю, що за актуальністю та новизною тематики, об’ємом і ґрунтовністю аналізу й інтерпретацією результатів проведеного дослідження, а також науково-теоретичним і практичним значенням дисертаційна робота відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки

України від 12 січня 2017 р. № 40 “Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій” і затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. № 44 “Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії”, а дисертантка – Зуб Анастасія Миколаївна – з урахуванням виконання в повному обсязі освітньої складової освітньо-наукової програми та індивідуального плану наукової роботи, заслуговує присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 “Біологія” за спеціальністю 091 “Біологія”.

Рецензент:

к.б.н., доцент кафедри біохімії
біологічного факультету
Львівського національного університету
імені Івана Франка

Галина ГАЧКОВА