

До спеціалізованої вченої ради  
ДФ 35.051.140  
Львівського національного  
університету імені Івана Франка  
м. Львів, вул. Університетська, 1

## ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, старшого наукового співробітника, провідного наукового співробітника відділу біохімії м'язів Інституту біохімії імені О.В. Палладіна НАН України  
**Даниловича Юрія Володимировича**  
на дисертацію **Манька Богдана Володимировича**  
«Особливості енергетичного забезпечення екзокринних клітин підшлункової залози за різних функціональних станів»,  
подану до захисту на здобуття ступеня доктора філософії  
з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

Дисертаційна робота Богдана МАНЬКА присвячена вивченню особливостей енергетичного забезпечення мітохондрій екзокринних клітин підшлункової залози, зокрема за зміни дієти на висококалорійну. Панкреатичний сік містить травні ензими, які забезпечують нормальне функціонування шлунково-кишкового тракту і обмін речовин в організмі вцілому. Підшлункова залоза включає в себе ацинарні клітини, які належать до її екзокринної частини. Процеси синтезу і секреції травних ензимів ацинарними клітинами підшлункової залози не можуть відбуватися без відповідного енергетичного забезпечення. Потужним джерелом АТФ є окисне фосфорилування у мітохондріях, інтенсивність якого змінюється у разі активації секреції секретогогами або під впливом стресових факторів. Дія таких чинників як жирні кислоти, активні форми кисню, жовчні кислоти та неоксидативні метаболіти алкоголю може вичерпувати запаси ацинарного АТФ.

Ожиріння є серйозною медичною проблемою значної частини населення у розвинутих країнах. Люди, які хворіють на ожиріння, мають високий ризик розвитку діабету, серцево-судинних захворювань, неалкогольних хвороб печінки і підшлункової залози, а також жовчнокам'яної хвороби; ожиріння є одним із факторів розвитку панкреатиту. Дані про порушення енергетичного обміну в ацинарних клітинах підшлункової залози за висококалорійних дієт є нечисельними, що складає актуальну наукову проблему.

Одним із методів дослідження біоенергетичних процесів у мітохондріях є полярографічний метод, який ґрунтується на реєстрації кількості поглинутого мітохондріями кисню в процесі окисного фосфорилування. Проте із початком вивчення дихання цілісних клітин із складнішою кривою запису, суттєво зросла

складність аналізу записаних полярограм. Таким чином, розробка автоматизованих рішень для опрацювання полярографічних записів дихання клітин та ізольованих мітохондрій є наразі невирішеною науковою задачею. Встановлення достовірного результату також неможливе без оцінки життєдіяльності клітин. Тому важливим є дослідження життєдіяльності клітин за нормальних функціональних станів, а також впливу патологічних чинників, зокрема ожиріння та дії жовчних кислот на ацинарні клітини підшлункової залози.

Отже, мета дисертаційної роботи Богдана МАНЬКА, а саме дослідити особливості енергетичного забезпечення ацинарних клітин за зміни дієти та інших функціональних станів, є сучасною і актуальною. На основі мети дисертантом грамотно сформульовані основні завдання роботи.

Дисертаційну роботу виконано на базі кафедри фізіології людини і тварин та Центру колективного користування клітинної біології та біоенергетики Львівського національного університету імені Івана Франка в рамках держбюджетних тем «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 проєкту у межах робочого часу викладачів «Транскрипційна і функціональна адаптація мітохондрій підшлункової залози та печінки до дієтарних чинників» (2021–2023 рр., № держреєстрації 0123U110302).

Дисертація загальним обсягом 138 сторінки складається з анотації українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи досліджень», чотирьох розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення отриманих результатів та висновків. Список використаних джерел містить 118 найменувань. Текст супроводжується 26 рисунками.

Структура рукопису відповідає класичній схемі. Він включає інформацію щодо сучасного стану проблеми та ряду нез'ясованих питань, опис методичних підходів автора, наведено результати власних досліджень із відповідним обговоренням. Текст дисертаційної роботи закінчується висновками та списком використаної літератури, а також додатком.

Розділ «Огляд літератури» містить достатньо повний аналіз сучасних даних з таких питань, як регуляція секреції підшлункової залози та фізіологічні особливості її енергетичного забезпечення. Автор детально зупиняється на особливостях функціонування мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози та біоенергетичних процесах в них за дії фізіологічно активних речовин. У розділі приділяється увага основам дослідження впливу режиму харчування на ацинарні

клітини. Дисертант відокремлює особливий розділ, присвячений складності цифрового аналізу біологічних сигналів та полярограм зокрема.

В розділі «Матеріали і методи дослідження» дано вичерпний опис адекватних поставленим задачам методів, які було використано дисертантом зокрема фізіологічних (моделювання ожиріння), фізико-хімічних (полярографія, флуоресцентна мікроскопія), фізичних, біохімічних (дослідження вмісту окремих фракцій ліпідів та глюкози у плазмі крові), препаративних (виділення ацинарних клітин та ізолювання мітохондрій), розробці алгоритмів та численним статистичним.

В рубриці «Результати досліджень» Богданом МАНЬКОМ розроблений оригінальний авторський алгоритм для аналізу полярографічних записів із автоматичною корекцією артефактів та шумів, а також пошуку оптимальних зон для обчислення результатів. Це автоматизоване програмне рішення дає змогу суттєво покращити якість та швидкість проведення обчислень і усуває суб'єктивний вплив експериментатора. Перевірка роботи алгоритму була здійснена як на штучно генерованих даних з відомою швидкістю та доданими спотвореннями, так і на реальних записах полярографічних досліджень дихання ізольованих мітохондрій печінки та ацинарних клітин підшлункової залози. Отже, дисертантом зроблено суттєвий внесок у подальше вдосконалення класичного полярографічного методу вивчення біоенергетичних процесів у мітохондріях.

Богданом МАНЬКОМ пропонується використовувати новий функціональний метаболічний тест для оцінки життєздатності ізольованих клітин, а саме стабільність роз'єданого дихання. Це здатність мітохондрій підтримувати високу швидкість роз'єданого дихання із збільшенням концентрації протонофора. Він визначається як співвідношення швидкості дихання за високих і низьких концентрацій FCCP. Встановлено, що стабільність роз'єданого дихання є тим вищою, чим більша життєздатність клітин ізольованих ацинусів підшлункової залози.

Автором продемонстровано, що у випадку утримання піддослідних тварин в умовах короткотривалої дієти з високим вмістом жиру та/або цукру спостерігається лише незначне збільшення рівня холестеролу за обох експериментальних дієт та маси вісцерального жиру за дієти із високим вмістом жиру і цукру. Зазначені дієти не спричинюють збільшення маси тіла, печінки, рівня глюкози, тригліцеридів та ліпопротеїнів високої та низької щільності у плазмі крові. Обидві короткочасні висококалорійні дієти не мають прямого впливу на дихальну функцію мітохондрій печінки.

Богданом МАНЬКОМ встановлено, що за короткочасної дієти із високим вмістом жиру спостерігається пригнічення базального дихання ацинарних клітин підшлункової залози за окиснення різних субстратів. Вперше показано, що

мітохондрії ацинарних клітин підшлункової залози здатні утилізувати кетонів тіла, про що свідчить збільшення максимальної швидкості роз'єданого дихання та приріст НАД(Ф)Н-автофлуоресценції за окиснення 3-гідроксибутирату.

Автором дисертаційної роботи показано, що причиною зменшення мембранного потенціалу мітохондрій внаслідок дії жовчної кислоти TLC-S у низькій концентрації 0,5 ммоль/л є порушення окиснення аланіну, але не пірувату. У високій концентрації (2 ммоль/л) TLC-S спричиняє порушення цілісності субклітинних мембран і, як наслідок, порушення життєздатності ацинарних клітин підшлункової залози.

Отже, в процесі виконання дисертаційної роботи Богданом МАНЬКОМ запропоновано і експериментально обґрунтовано новий параметр для характеристики мітохондрійного дихання – стабільність роз'єданого дихання, тобто здатність мітохондрій підтримувати високу швидкість роз'єданого дихання із збільшенням концентрації протонофора. Встановлено, що стабільність роз'єданого дихання є тим вищою, чим більша життєздатність клітин ізольованих ацинусів підшлункової залози. Також розроблено автоматизоване програмне рішення алгоритму для аналізу полярографічних записів із автоматичною корекцією артефактів, осциляторних і випадкових шумів та пошуком оптимальних зон для обчислення. Отримані дисертантом експериментальні дані дають змогу краще зрозуміти механізми дії чинників середовища на функціонування мітохондрій в ацинарних клітинах підшлункової залози. Результати досліджень можуть бути використані для розробки профілактичних заходів, спрямованих на недопущення розвитку захворювань підшлункової залози.

Представлена дисертація являє собою класичну фізіологічну роботу з виходом на практику, а саме в ній пропонується алгоритм та методика розрахунків для автоматичного аналізу даних полярографії. Її цінність полягає у комплексному підході до вирішення поставлених задач, поєднанні методів регресійного аналізу, описової статистики, розробки алгоритмів із класичними фізіологічними та біохімічними. Отже, **наукове і практичне значення зробленої роботи безсумнівне.**

Наведені в кінці дисертації висновки впливають з завдань і є правомірними. Рисунки демонстративні, наведена коректна статистична обробка експериментальних результатів. Використано численні методи дослідження, які повністю відповідають меті та завданням роботи.

За матеріалами дисертації опубліковано 7 наукових робіт, зокрема, 3 статті у фахових виданнях, що відповідають вимогам Постанови №44 Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради

закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», серед них 2 статті у виданнях, що входять до наукометричної бази Scopus, 4 тези доповідей на міжнародних конференціях. Зазначені публікації здобувача в повному обсязі, на високому науковому рівні висвітлюють результати експериментальних досліджень, що увійшли до рукопису дисертації.

Позитивною рисою роботи є використання широкого спектру методичних підходів як фізіологічних (моделювання дієто-індукованого ожиріння), біохімічних (визначення вмісту ліпідів) та фізико-хімічних (полярографія, флуоресцентна мікроскопія), так і методів розробки алгоритмів, широкого спектру статистичних методів тощо.

Представлена дисертаційна робота не містить ознак академічної недоброчесності.

### **Зауваження.**

1. На мій погляд, в роботі занадто багато уваги приділяється негативним результатам.

2. Було б доцільним в кінці літогляду розмістити невеликий підрозділ, де б коротко сумувалися невирішені задачі в межах проблеми і був зроблений логічний перехід до експериментальної частини.

3. Не всі аббревіатури і скорочення винесені до переліку умовних позначень. Зокрема, відсутня аббревіатура TLC-S.

4. В англійській анотації краще використовувати розмірності концентрацій не  $\text{mmol/L}$ , а  $\text{mM}$ .

### **Запитання.**

1. Чим Ви пояснюєте експериментальний факт майже повного зниження рівня клітинного НАД(Ф)Н (саме відновленої форми) за блокування гліколізу в ацинарних клітинах? Отже за цих умов є можливість функціонування пентозофосфатного циклу, де відновлюється НАДФ, та мітохондрійних процесів, пов'язаних з функціонування піруватдегідрогеназного комплексу та реакцій циклу Кребса, де відновлюється НАД.

2. Які, з Вашої точки зору та даних літератури, механізми можуть лежати в основі кальцієвого перевантаження ацинарних клітин за дії жовчних кислот? Чи можуть жовчні кислоти бути токсичними для інших типів клітин?

3. Чи не буде доречним в подальшій експериментальній роботі використовувати більш тривалі дієти, які б призводили до більш суттєвих змін досліджуваних показників?

Наведені зауваження не знижують науково-практичну цінність проведеного дослідження. За актуальністю теми, науковою новизною, теоретичною і практичною цінністю, об'ємом експериментального матеріалу, самостійного внеску здобувача і зроблених висновків дисертація є окремим завершеним дослідженням. **Вважаю, що Манько Богдан Володимирович заслуговує присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».**

**Загальний висновок.** Дисертаційна робота відповідає «Вимогам до оформлення дисертації», що затверджені наказом Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. № 40, «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», що затверджений постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44, та «Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)», який затверджений постановою Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 р. № 261. Отже, здобувач Манько Богдан Володимирович заслуговує на присудження йому ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент  
доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник,  
провідний науковий співробітник  
відділу біохімії м'язів  
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Юрій ДАНИЛОВИЧ