

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, професора, професора кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені

Василя Стефаника Луцака Володимира Івановича

на дисертацію **Манька Богдана Володимировича** на тему «Особливості енергетичного забезпечення екзокринних клітин підшлункової залози за різних функціональних станів», подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія із галузі знань 09 Біологія

Актуальність теми дисертації. Екзокринна частина підшлункової залози відіграє важливу роль у процесах травлення. Порушення функціонування екзокринної частини підшлункової залози неминуче призводить до розвитку гострого чи хронічного панкреатиту, порушення процесів травлення і всмоктування у тонкому кишківнику, інтенсифікації запальних процесів і, відтак, до порушення секреції гормонів ендокринною частиною підшлункової залози та регуляції метаболізму вуглеводів, до незворотних змін в організмі чи навіть до його загибелі. Клітинні механізми, які лежать в основі цих патологічних процесів у підшлунковій залозі, залишаються не до кінця з'ясованими. Насамперед це стосується особливостей та змін енергетичного забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози за дії різноманітних чинників.

Відтак, **мета** дисертаційного дослідження Богдана Манька – дослідити особливості енергетичного забезпечення ацинарних клітин за зміни характеру харчування та інших функціональних станів – є актуальною, а сформульовані у дисертації **завдання дослідження** забезпечують реалізацію поставленої мети.

Наукові **методи** дослідження є різноманітні: *фізіологічні* – моделювання індукованого певним харчуванням ожиріння тварин; *препаративні* – виділення і характеристика ацинарних клітин підшлункової залози та ізоляція мітохондрій печінки; *фізико-хімічні* – полярографічний метод дослідження швидкості дихання, світлова мікроскопія для підрахунку клітин та оцінки їхньої життєздатності, флуоресцентна мікроскопія для реєстрації мембранного потенціалу мітохондрій та автофлуоресценції НАД(Ф)Н; *фізичні* – зважування; *біохімічні* – визначення вмісту холестеролу, ліпопротеїнів низької щільності, ліпопротеїнів високої щільності, тригліцеридів та глюкози у плазмі крові; *прикладні* – методи розробки алгоритмів; *статистичні* – регресійний аналіз, описова статистика, t-тест Стюдента, двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA

з повтореннями з подальшими post-hoc t-тестами корегованими за методом Голм-Бонферроні. Ці методи є сучасними, високоінформативними, достатньо складними, трудомісткими, а їхнє застосування свідчить про високий науковий рівень отриманих результатів, а також про високу кваліфікацію самого дослідника.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано на базі кафедри фізіології людини і тварин, а також 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., номер держреєстрації 0118U003604), «Функціональна оцінка мітохондрій: пайплайн для виявлення механізмів передпатологічних станів травних залоз» (2023–2025 рр., номер держреєстрації 0123U101951), а також проєкту у межах робочого часу викладачів «Транскрипційна і функціональна адаптація мітохондрій підшлункової залози та печінки до дістарних чинників» (2021–2023 рр., номер держреєстрації 0123U110302).

Структура роботи. Дисертація викладена на 138 сторінках і складається зі вступу, чотирьох розділів («Огляд літератури», «Матеріали і методи дослідження», «Результати досліджень та їхнє обговорення» та «Узагальнення»), а також висновків і списку використаної літератури. Робота містить 26 рисунків. Список використаної літератури налічує 118 джерел літератури.

Вступ. У цьому розділі описано актуальність теми, мету і завдання дослідження; сформульовані визначення об'єкту та предмету дослідження; перераховані методи дослідження; висвітлені зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами; описані наукова новизна і практичне значення роботи; зазначений власний внесок автора, а також вказані публікації та апробація результатів дисертаційного дослідження.

Огляд літератури. Автором висвітлені особливості функціонування та енергетичного забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози та їхні зміни за дії біологічно активних речовин. У наступній частині охарактеризований сучасний стан досліджень впливу різних дієт на ацинарні клітини підшлункової залози. Окремий підрозділ присвячений характеристиці цифрового аналізу біологічних сигналів та полярограм.

Матеріали та методи дослідження. Тут описані умови утримання та основні засади поводження з лабораторними тваринами. Досить детально описані модель хронічного дослідження впливу дієт, методика отримання панкреатичних ацинусів, виділення мітохондрій печінки та біохімічні методи дослідження крові щурів. Описані методики полярографічного вимірювання швидкості споживання кисню і флуоресцентної мікроскопії. Охарактеризовані використані методи розробки алгоритмів, а також описана статистична обробка

результатів з використанням програмного забезпечення Microsoft Office Excel та OriginPro 2018.

Результати досліджень та їхнє обговорення. Автором дисертаційного дослідження описана сама процедура розробки алгоритму обробки полярограм та визначення зміни швидкості дихання, зокрема детально охарактеризований принцип роботи алгоритму (серілізація вхідних даних, підготовки даних, очищення записів від шумів, човниковий алгоритм визначення швидкості дихання, визначення поліноміальної регресії), а також перевірку розробленого алгоритму на штучно згенерований та справжніх експериментальних даних. Охарактеризована залежність роз'єданого дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози від життєздатності клітин. Описані результати дослідження та обговорені життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози та рівень мембранного потенціалу мітохондрій за дії жовчної кислоти TLCS. Окремий підрозділ присвячений опису хронічного дослідження енергетичного забезпечення екзокринних клітин за короткотривалого споживання їжі з високим вмістом жиру, а також з високим вмістом жиру і цукру.

Узагальнення містить коротке (загальне) обговорення та власне узагальнення результатів дослідження.

Висновки дисертаційної роботи відповідають меті і завданням роботи, випливають з отриманих результатів і висвітлюють головні наукові здобутки роботи.

Обґрунтованість та достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертація Богдана Манька на тему «Особливості енергетичного забезпечення екзокринних клітин підшлункової залози за різних функціональних станів» є завершеною кваліфікаційною роботою, в якій отримані нові наукові результати, що мають теоретичну і практичну цінність. У дисертації наведені результати теоретичних досліджень (розробка алгоритму обробки полярограм та визначення швидкості зміни показника), гострих (залежність дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози від деяких чинників) та хронічних експериментальних досліджень (енергозабезпечення екзокринних клітин підшлункової залози за звичайного та двох експериментальних типів харчування). Усі дослідження проведені з використанням достатньої кількості експериментального матеріалу і повторюваності дослідів. Умови проведення хронічних експериментів (склад та енергетична цінність дієт, експериментальні процедури тощо) описані достатньо детально. Отримані результати були ретельно проаналізовані з використанням сучасних методів біологічної статистики. Результати експериментальних досліджень автора порівняні результатами подібних наукових публікацій, які доступні в літературі. У кінці кожного підрозділу отриманих результатів наведені короткі висновки, де узагальнені дані власних досліджень. Виклад основного матеріалу дисертації відзначається високим науково-теоретичним рівнем.

Наукова новизна одержаних результатів. У результаті проведення експериментальних досліджень запропонований новий тест для оцінки мітохондріального дихання – стабільність роз'єданого дихання, тобто здатність мітохондрій підтримувати високу швидкість роз'єданого дихання зі збільшенням концентрації протонофору. Цей тест є достатньо адекватним, функціональним і корелює з життєздатністю клітин ізольованих ацинусів підшлункової залози. У роботі також було вперше показано, що внаслідок дії жовчної кислоти TLC-S (0,5 ммоль/л) зменшується мембранний потенціал мітохондрій внаслідок порушення окислення аланіну, але не пірувату.

У дисертаційній роботі проведено комплексне дослідження впливу на організм щурів короткотривалих типів харчування – з високим вмістом жиру і з високим жиру і цукру. Показано, що у тварин експериментальної групи спостерігається лише незначне збільшення рівня холестеролу за обох експериментальних характерів харчування та маси вісцерального жиру у випадку вживання їжі з високим вмістом жиру і цукру. Споживання висококалорійні їжі протягом семи тижнів не змінювало дихальну функцію мітохондрій печінки. Вперше встановлено, що за короткочасної їжі з високим вмістом жиру спостерігається незначне пригнічення базального дихання ацинарних клітин підшлункової залози за окислення глюкози окремо чи в комбінації з піруватом або 3-гідроксибутиратом. Вперше показано, що мітохондрії ацинарних клітин підшлункової залози здатні утилізувати кетонові тіла, про що свідчить збільшення максимальної швидкості роз'єданого дихання та приріст НАД(Ф)Н-аутофлуоресценції за окислення 3-гідроксибутирату.

Практичне значення роботи. Дисертаційна робота має потенційне практичне значення, оскільки її результати можуть бути використані для розробки профілактичних заходів, які спрямовані на недопущення розвитку чи метаболічної корекції захворювань підшлункової залози (наприклад, біліарного панкреатиту). Одержані результати досліджень, а також методологічні напрацювання можуть бути впроваджені під час підготовки спеціалістів медико-біологічного профілю у навчальних закладах вищої освіти України і частково вже впроваджені у Львівському національному університеті імені Івана Франка. Розроблене автоматизоване програмне рішення алгоритму для аналізу полярографічних записів з автоматичною корекцією артефактів, осциляторних і випадкових шумів та пошуком оптимальних зон для обчислення потрібно рекомендувати усім студентам, аспірантам і науковим співробітникам, які використовують методи полярографічної реєстрації дихання ізольованих мітохондрій чи клітин, для обробки їхніх експериментальних даних.

Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях. Дисертація Манька Б.В. «Особливості енергетичного забезпечення екзокринних клітин підшлункової залози за різних функціональних станів» виконана на достатньому експериментальному матеріалі з використанням адекватних

сучасних методів дослідження відповідно до мети та завдань роботи. Наукові положення та висновки достатньо обґрунтовані, впливають зі змісту дисертаційної роботи, мають теоретичне і практичне значення.

Матеріали дисертаційної роботи повністю відображені у семи наукових працях, з яких три – це статті у фахових наукових виданнях (з яких дві статті з видань, які входять у наукометричну базу Scopus, і одна стаття в українському фаховому журналі) та четверо тез доповідей у матеріалах міжнародних наукових конференцій. Матеріали дисертації апробовані на п'яти міжнародних наукових конференціях, а також на наукових семінарах кафедри фізіології людини і тварин та на щорічних звітних наукових конференціях біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності. У дисертації Манька Б.В. «Особливості енергетичного забезпечення екзокринних клітин підшлункової залози за різних функціональних станів» немає ознак академічного плагіату, самоплагіату, фабрикації, фальсифікації та інших порушень академічної доброчесності, що могли б поставити під сумнів самостійний характер виконання дисертаційного дослідження.

Дискусійні положення, запитання та зауваження щодо змісту та оформлення дисертації Богдана Манька.

1. У результаті проведення гострих досліджень залежності дихання ізольованих ацинусів від концентрації FCCP було запропоновано новий метаболічний функціональний тест – стабільність роз'єданого дихання, який характеризує здатність мітохондрій підтримувати високу швидкість роз'єданого дихання із збільшенням концентрації протонофора. Як ви гадаєте, чи варто застосувати цей функціональний тест не лише у гострих, а й хронічних експериментах?
2. Ви охарактеризували роз'єдане дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози за дії різних чинників, використавши протонофор FCCP. Як ви думаєте, чи вільно проникає FCCP крізь плазматичну мембрану клітин? Чи не впливає те, що ви використовували препарат клітин (а не мітохондрій), на його властивості як протонофора?
3. У ході проведення хронічних дослідів ви змінювали склад та енергетичну цінність їжі щурів, додаючи до збалансованого корму тваринні жири та сахарозу. Наскільки оправданим є використання терміну «дієта» у цьому випадку? Можливо, краще було б застосувати термін «харчовий раціон» чи «тип (характер) харчування»?
4. Мабуть, недоцільно вживати термін «короткочасна (7 тижнів) дієта». Про «дієту» я згадав вище, а «корокочасна» відносний термін, який реально нічого не означає. Якщо хочеться наголосити саме на тривалості, то краще писати «семитижнева». Проте в більшості

випадків у тексті й цього на варто писати, якщо десь раніше вже описана постановка експерименту.

5. Наскільки доступне для широкого вільного вжитку розроблене програмне забезпечення для опрацювання результатів полярографічного дослідження мітохондріального дихання інших тканин та органів? Наскільки універсальним є запропонований вами алгоритм для аналізу полярографічних записів?
6. І насамкінець – вважаю, що ніяк не принижуючи якість журналів, у яких опубліковані статті з результатами досліджень, для ширшої доступності отриманих результатів, їх варто було б опублікувати у солідних міжнародних виданнях з високим імпаکت-фактором.

Загальний висновок про відповідність роботи встановленим вимогам.

Аналіз дисертації та опублікованих праць дає підстави для висновку про те, що дослідження Богдана Манька є завершеним, цілісним та самостійним. Вважаю, що його дисертаційна робота на тему «Особливості енергетичного забезпечення екзокринних клітин підшлункової залози за різних функціональних станів» за змістом, рівнем наукової новизни, практичним значенням та характером висновків відповідає спеціальності 091 Біологія із галузі знань 09 Біологія та чинним вимогам до оформлення дисертацій, затвердженим Наказом Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 р. «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій», а також 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 № 44 від 12.01.2022 р. (із змінами, внесеними згідно з постановами Кабінету Міністрів України від 21.03.2022 р. № 341 та від 19.05.2023 р. № 502), а її автор – Богдан Манько – заслуговує на присудження йому наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія із галузі знань 09 Біологія.

Офіційний опонент,
професор кафедри біохімії та біотехнології
Прикарпатського національного
університету імені Василя Стефаника,
доктор біологічних наук, професор

Володимир ЛУЦАК