

ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертаційну роботу Срібної Валентини Олександрівни «Розлад оваріальної функції в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження», подану до спеціалізованої Вченої ради Д26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук зі спеціальності 14.03.04 — патологічна фізіологія

Актуальність теми. Численні дослідження свідчать про надзвичайну поширеність безпліддя поміж подружніх пар, яка в середньому дорівнює 15-20 %. Вчені дійшли згоди, що «провина» за це лягає однаковою мірою на чоловіка й жінку. Однією з провідних причин є розлади оваріальної функції, які мають різноманітну етіологію та патогенетичні шляхи розвитку. Проблема набула особливо важливого значення у наші часи гендерної рівності, коли зросла роль жінки у соціальному житті та господарчо-виробничій діяльності, а також набули практичного втілення допоміжні репродуктивні технології. Через це чимало жінок беруть шлюб у віці після 30 років і зважуються на першу вагітність у 35-річному віці, а подекуди й пізніше. Тому вивчення механізмів виникнення оваріальної недостатності, перш за все, передчасного виснаження генеративної функції яєчників, вважають дійсно актуальним.

Досліджуючи патогенез зазначених розладів, неможливо оминати такий ймовірний чинник, як порушення імунного статусу та системне запалення. Щодо цього є певні клінічні докази та відповідні публікації у науковій літературі. В.О.Срібна використала можливості експериментальної моделі порушення оваріальної функції, зумовленої наявністю в організмі мишей штучно індукованих циркулюючих імунних комплексів. Головну увагу дослідниця зосередила на одному з ключових репродуктивних процесів, а саме, мейотичному дозріванні ооцитів. Таким чином, тема дисертаційної роботи В.О.Срібної має бути визнана актуальною, зокрема, враховуючи, що вона не обмежилась вивченням особливостей експериментальної моделі, але й перевірила терапевтичні властивості

наночастинок нульвалентного заліза (НЧНЗ), антиоксидантів та інших біологічно активних речовин.

Наукова новизна та ступінь обґрунтованості висновків, сформульованих у дисертації. Дані дисертаційної роботи отримані з використанням апробованих сучасних методів, які є адекватними відповідно до вирішення конкретних завдань. Обсяг фактичного матеріалу, його інтерпретація та коректне статистичне опрацювання переконують в обґрунтованості висновків роботи.

Сукупність результатів дисертаційного дослідження характеризують його новизну. Вперше виявлено, що в умовах експериментального імунного ушкодження (ЕІУ), яке досягається довготривалою, протягом 6 тижнів, імунізацією бичачим сироватковим альбуміном (БСА), відбувається розлад оваріальної функції і пошкоджується ДНК ядер тимуса і лімфатичних вузлів.

Вперше доведено, що в умовах ЕІУ введення антиоксиданте (мексидолу) покращує параметри мейотичного дозрівання ооцитів, а також призводить до зниження клітинної загибелі фолікулярного оточення ооцитів (ФОО), тобто *zona granulosa*. Також виявлено зменшення пошкодження ДНК ядер клітин тимуса, лімфатичних вузлів та клітин ФОО.

В.О.Срібна вперше довела, що параметри мейотичного дозрівання ооцитів (метафаза I і метафаза II) і життєздатності клітин ФОО покращуються після введення препарату НЧНЗ в умовах ЕІУ, так само як і параметри життєздатності клітин органів імунної системи – тимуса та лімфатичних вузлів на тлі зменшення в них пошкодження ДНК.

До безперечно нових даних, отриманих особисто здобувачем наукового ступеня, належить і те, що *in vitro* відбувається відновлення мейотичного дозрівання ооцитів і зменшення одониткових розривів ДНК під дією антиоксиданта - ресвератролу, блокатора полі(АДФ-рибозо)полімерази (ПАРП) 4-гідроксиквіназоліну, субстрата NO-синтази - L-аргініну, блокатора iNOS – аміногуанідину. Це свідчить про участь оксиду азоту в репарації ДНК ооцитів.

Теоретичне та практичне значення роботи. Отримані дані мають фундаментальне значення для патофізіології репродуктивної системи та імунології. Вони сприяють більш чіткому розумінню процесів, які відбуваються в яєчнику та органах імунної системи в умовах системного імунокомплексного ушкодження організму. З практичної точки зору це створює базу для вдосконалення фармакотерапії передчасного виснаження яєчників у жінок шляхом можливого застосування досліджених В.О.Срібною антиоксидантів і НЧНЗ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана в межах НДР відділу імунофізіології Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України: «Дослідження молекулярно-генетичних та імунопатологічних механізмів функціональних порушень жіночої репродуктивної системи та можливості їх корекції». Державний реєстраційний номер теми 0112U008233.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація оформлена згідно вимог ДАК МОН України, викладена на 129 сторінках машинописного тексту і складається з анотації, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, основної частини (огляд літератури, опис застосованих методів і матеріалів досліджень, 4 розділи експериментальних результатів та їх обговорення), висновків, списку використаних джерел зі 257 найменуваннями та додатку. Робота проілюстрована 31 рисунком та 12 таблицями.

Слід відзначити чітку структурованість, послідовність і логічність викладення, якісне оформлення тексту. Якісний ілюстративний матеріал відповідає отриманим даним і сприяє кращому розумінню думок автора дисертації.

У «Вступі» представлено обґрунтування актуальності теми дослідження, сформульовано загальну мету дослідження та чітко поставлено чотири завдання. Окрім цього добре висвітлюється наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне і практичне значення, наводяться вичерпні

відомості щодо особистого внеску здобувача, апробації та публікації результатів дослідження.

«Огляд літератури» складається з трьох частин. Перша частина присвячена аналізу даних літератури про передчасну недостатність яєчників, як розлад оваріальної функції; друга – про пошкодження ДНК як об'єкт впливу активних форм кисню та антиоксидантних систем захисту; третя частина присвячена даним про нітрозативний стрес і зсув в метало-лігандному гомеостазі.

Отже; зміст огляду літератури безпосередньо стосується мети і завдань дисертації. Аналіз літературних джерел проведено якісно, із залученням сучасних робіт, що дає досить повне уявлення про стан проблеми.

Розділ 2 «Матеріали та методи дослідження». Експериментальна частина роботи виконана із дотриманням усіх вимог щодо роботи з тваринами (Конвенція Ради Європи про охорону хребетних тварин, 1986р., Директиви ЄС №609,1986р., Наказ МОЗ України №66, 2006р., Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV, 2006р.).

Всі методичні підходи, що були використані у роботі, а саме, метод культивування ооцитів *in vitro*, метод ДНК-комет, метод прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками, статистичні методи обробки отриманих результатів є адекватними і сучасними та досить повно описані автором у цьому розділі.

Детально описана використана у роботі модель експериментального імунокомплексного ушкодження у мишей, яка крім імунного компонента характеризується й порушенням естрального циклу, зниженням маси яєчника, зменшенням кількості преовуляційних ооцитів у яєчниках. Наявні також і структурні зміни тканини яєчника - атрофія кіркового шару, зменшення кількості примордіальних, первинних, вторинних, третинних фолікулів і жовтих тіл, натомість кількість атретичних фолікулів зростає.

Схеми експериментів деталізовані, відповідають проведеним серіям дослідів та представлені у вигляді таблиць.

Результати власних досліджень представлені у чотирьох розділах.

Розділ 3 - «Розлад оваріальної функції в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження». Описані у цьому розділі дані свідчать про те, що імунізація самиць мишей зростаючими дозами бичачого сироваткового альбуміну (як модель експериментального імунокомплексного ушкодження), окрім активації клітин вродженого та адаптивного імунітету, призводить до пошкодження ДНК клітин органів імунної системи (тимуса та лімфатичних вузлів) та порушення оваріальної функції, що проявляється пригніченням мейотичного дозрівання ооцитів, посиленням клітинної загибелі фолікулярного оточення ооцитів, що частково відображає розлад репродуктивної функції у жінки – передчасну недостатність яєчників.

У розділі 4 «Вплив введення антиоксиданта на мейотичне дозрівання ооцитів, життєздатність клітин їх фолікулярного оточення та розподіл одониткових розривів ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження» встановлено, що введення антиоксиданта – етилметилгідроксипіридин сукцинату (ГС, препарат «Мексидол») в умовах ЕІУ покращує параметри мейотичного дозрівання ооцитів, знижує клітинну загибель фолікулярного оточення ооцитів та зменшує ступінь пошкодження ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів, що розширює відомості про застосування препарату «Мексидол» та дає можливість рекомендувати його для подальшого вивчення та корекції розладу оваріальної функції імунного генезу.

Розділі 5 «Вплив введення наночастинок нульвалентного заліза (НЧНЗ) на функціональний стан яєчника, тимуса та лімфатичних вузлів в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження» охоплює 6 підрозділів, в яких розглянуто ефект впливу НЧНЗ на функціональний стан яєчника, тимуса та лімфатичних вузлів в умовах ЕІУ. Зокрема, автором

встановлено, що використані у роботі НЧНЗ в умовах ЕІУ чинять коригуючий ефект на розлад оваріальної функції та зменшують пошкодження в клітинах органів імунної системи.

Також у розділі представлені дані про функціональний стан яєчника, тимуса та лімфатичних вузлів в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження і введення блокатора iNOS, субстрата NOS та застосування НЧНЗ і показано що в умовах ЕІУ введення аміногуанідину у дозі 25 мг/кг покращує параметри мейотичного дозрівання ооцитів і зменшує клітинну загибель та пошкодження геному ФОО, в той час, як введення L-аргініну в дозі 150 мг/кг за даних умов чинить пригнічувальний ефект на відновлення мейотичного дозрівання ооцитів. В умовах експериментального імунокомплексного ушкодження застосування НЧНЗ зменшує пригнічуючий ефект L-аргініна на ооцити.

Розділ 6 «Вплив антиоксиданта (ресвератрол), блокатора ПАРП (4-ГК), субстрата NOS (L-аргінін), блокатора iNOS (аміногуанідин) на *in vitro* відновлення мейотичного дозрівання ооцитів та на розподіл ОНР ДНК ядер ооцитів» – присвячений вивченню відновлення мейотичного дозрівання ооцитів та особливостей регуляції репарації, що відображається, як зміна кількості одониткових розривів ДНК ооцитів в системі *in vitro* із використанням антиоксиданта - ресвератролу, блокатора ПАРП - 4-гідроксиквіназоліну, субстрата NOS - L-аргініну, блокатора iNOS - аміногуанідину. Встановлено, що оксид азоту задіяний в регуляції репарації, що відображається як зменшення кількості одониткових розрив.

Всі розділи завершуються підсумковими узагальненнями (висновками).

Аналіз та узагальнення результатів досліджень подано у 7-му розділі дисертаційної роботи. Тут автор підсумовує отримані дані, аналізує матеріали дослідів, порівнює їх із сучасними даними літератури. Обговорення отриманих результатів проведено об'єктивно та змістовно.

Роботу завершують шість висновків, які повністю віддзеркалюють експериментальні дані, отримані дисертанткою, і базуються на фактичних результатах досліджень.

Список літератури подано згідно вимог до оформлення відповідного розділу дисертаційної роботи.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. Результати дисертаційної роботи викладено в 22-х публікаціях: 8 статей у провідних вітчизняних і зарубіжних фахових наукових журналах, рекомендованих ДАК МОН України, та 13 тез доповідей на конференціях. Отримано деклараційний патент на корисну модель «Спосіб оцінки впливу наночастинок нульвалентного заліза на репродуктивну та імунну системи в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження у мишей» (№112982 від 10.01.2017, Бюл.№1).

Автореферат відображає основний зміст дисертації, добре ілюстрований, структурований згідно існуючих вимог.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації. Незважаючи на достатньо ретельний і відповідний вимогам рівень оформлення дисертації, можна зробити деякі зауваження та поставити дисертантові запитання.

Зауваження:

1. Оваріальна функція складається з генеративної та гормональної. У дисертаційному дослідженні вивчалась лише генеративна, отже, на думку опонента, назва роботи надто широко сформульована.
2. Не вказано кількості використаних в роботі тварин.
3. У другому розділі (Матеріали та методи дослідження) вказується, що в умовах імунізації БСА (модель EIU) спостерігається зменшення: 1) маси яєчника; 2) кількості ооцитів в яєчнику; 3) кількості примордіальних, первинних, вторинних і третинних фолікулів та жовтих тіл; 4) зростання кількості атретичних фолікулів; 5) порушення естрального циклу у дослідних

тварин у порівнянні з контрольними тваринами. Ці дані отримані автором і логічно було винести їх у Розділ 3: «Розлад оваріальної функції в умовах ЕІУ».

4. У розділі 5 «Вплив введення НЧНЗ на функціональний стан яєчника, тимуса та лімфатичних вузлів в умовах ЕІУ» слід було б обґрунтувати відсутність двох групи тварин, таких як контроль на блокатор іNOS і субстрат NOS.

При рецензуванні роботи виникли такі **запитання** до автора:

1. Яким чином контролювали наявність імунних комплексів у дослідних тварин?
2. Чи є впевненість у тому, що імунні комплекси проникають крізь гематооваріальний бар'єр? Зазвичай це перевіряють за допомогою мічених флуоресцеїном антитіл.
3. Враховуючи пошкодження тимоцитів при імунізації БСА, чи враховувалась можливість участі клітинного імунітету в розладах оваріальної функції?
4. Чим пояснити різну спрямованість ефектів наночастинок заліза стосовно ооцитів за нормальних умов і при імунізації БСА?

Зроблені зауваження не знижують теоретичної та практичної цінності дисертації, не знижують позитивної оцінки дисертації в цілому, а також зроблених основних висновків.

Наукові та практичні результати проведених досліджень можна кваліфікувати як нове вирішення актуального наукового завдання.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.
Дисертаційна робота Срібної Валентини Олександрівни «Розлад оваріальної функції в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження» є закінченим науковим дослідженням і відповідає спеціальності «Патологічна фізіологія». Вона містить раніше не захищені основні положення. За критеріями актуальності, новизни, науково-практичного значення, аргументованості висновків, якості викладення матеріалу і повноти їх

оприлюднення у фахових наукових виданнях, робота відповідає вимогам пункту 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 №567 (зі змінами), а її виконавець, Срібна Валентина Олександрівна, заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 — патологічна фізіологія.

Офіційний опонент:

завідувач відділу ендокринології репродукції і адаптації

ДУ «Інститут ендокринології і обміну речовин ім.В.П. Комісаренка

НАМН України», доктор медичних наук, професор,

академік НАМН України, чл.-кор. НАН України

17.01.2018 р.



Резніков О.Г.

Державна установа	
ІНСТИТУТ ЕНДОКРИНОЛОГІЇ ТА ОБМІНУ РЕЧОВИН	
ІМ. В. П. КОМІСАРЕНКА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ	
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ	
Власноручний підпис <i>Резніков О.Г.</i>	Засвідчую
Старший інспектор з кадрів <i>Вас</i>	2018 р.