

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертацію Ступчук Марії Сергіївни «Вплив модуляторів сиртуїнів та наночастинок срібла на функціонування клітин яєчника миші», подану до спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за фахом 03.00.13 - фізіологія людини й тварин

Актуальність теми. Охорона здоров'я матері і дитини визначається як пріоритетний напрямок державної політики України. Разом із цим рівень народжуваності на одну жінку в Україні є одним із найнижчих серед країн Європи. Однією з головних причин такого стану є високий рівень безпліддя серед населення дітородного віку. Факторів, що ініціюють такий стан дуже багато - від соціальних чинників і умов життя до загального стану медичної галузі в Україні.

Одним із засобів боротьби із безпліддям є створення клінік допоміжних репродуктивних технологій, де отримують преовуляторні ооцити, проводять їхнє запліднення *in vitro* та переносять ембріони в порожнину матки. Однак ефективність такої процедури загалом не перевищує 30%, оскільки фундаментальні механізми, які лежать в основі успішного запліднення, нормального розвитку ембріонів їхнього виношування та самого народження залишаються не до кінця з'ясованими. Вивчення таких механізмів набуває сьогодні першорядного значення не тільки для успішного функціонування таких клінік, а й для вирішення питання зростання рівня народжуваності в Україні.

На сьогодні визначення ролі сиртуїнів (SIRT) у процесі мейотичного дозрівання ооцитів є перспективним напрямком, що може сприяти отриманню позитивних результатів у допоміжних репродуктивних

технологіях шляхом підвищення фертильності і збільшення потенціалу розвитку ранніх ембріонів.

Безпліддя є однією із складних проблем у жінок репродуктивного віку з аутоімунними розладами. Так, у пацієнтів-жінок з імунним ушкодженням нирок, високовірогідним є ускладнення імплантації. Останнє, в свою чергу, становить серйозну проблему для нормального функціонування жіночої репродуктивної системи та, відповідно, значно знижує вірогідність успішного проходження процесу запліднення, навіть у разі застосування допоміжних репродуктивних технологій.

За останні роки використання нанопрепаратів у фармакології як субстанції для нових лікарських засобів набирає все більше обертів. Перспективними в цьому аспекті є наночастинки металів, зокрема наночастинки срібла (НЧС). Проте, можливі механізми протективної або токсичної дії НЧС досліджено недостатньо.

Зважаючи на те, що представлена дисертаційна присвячена дослідженню ролі сиртуїнів та наночастинок срібла на функціонування клітин яєчника, вона є актуальною і дозволяє зняти ряд питань сучасної фізіології, фундаментальної біології та репродуктивної медицини.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне та практичне значення. Результати проведених досліджень можна кваліфікувати як вирішення актуального наукового завдання.

Автором вперше показано, що інгібітор сиртуїнів нікотинамід змінює параметри життєздатності клітин фолікулярного оточення ооцитів (ФОО) за рахунок його впливу на функціонування мітохондрії. Тоді як в умовах оксидативного стресу транскрипційний фактор NF-κB відіграє істотну роль у механізмі дії ресвератролу (активатор SIRT1) на процес мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатність клітин ФОО.

Більше того, встановлено, що в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження, яке досягали імунізацією

гомогенатом нирки, у тварин погіршуються характеристики мейотичного дозрівання ооцитів, збільшується кількість клітин фолікулярного оточення ооцитів з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу, відбуваються зміни у експресії генів *COX2*, *Grem1* та *HAS2* у клітинах фолікулярного оточення ооцитів та зростає рівень первинних пошкоджень ДНК клітин фолікулярного оточення ооцитів.

Отримано нові дані про те, що в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження застосування активатора сиртуїнів ресвератролу *in vitro* покращує характеристики мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатність фолікулярних клітин, а також знижує частку пошкодження ДНК цих клітин.

Нові дані отримано і про вплив наночастинок срібла - їх внутрішньовенне введення не впливає на ДНК клітин фолікулярного оточення ооцитів, а в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження параметри мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатність фолікулярних клітин під дією НЧС покращуються, окрім цього зменшується ступінь пошкодження ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів.

Отже, автором отримано нові дані про сиртуїн-залежний механізм регуляції репродуктивної функції. Також робота доповнює відомості стосовно функціонального стану яєчника в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження, що також розширює наше розуміння того, що може відбуватися з ооцитами у клінічних випадках системних імунних розладів.

Ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків, сформульованих в дисертації, їх достовірність, повнота викладання в публікаціях. Наукові положення дисертаційної роботи базуються на використанні цілого комплексу сучасних методів. Висновки по кожній серії проведених експериментів базуються на достатній кількості спостережень, їх

адекватному статистичному аналізу, а також їх обговоренні. Все це разом забезпечило достовірність і обґрунтованість наукових положень і висновків.

Результати дисертаційної роботи викладено в 24 публікаціях; 10 з яких - статті у провідних вітчизняних і зарубіжних фахових наукових журналах, 13 - тези доповідей на конференціях та наукових з'їздах, 1 - патент на корисну модель.

Всі положення дисертаційної роботи представлялися для обговорення на міжнародних і вітчизняних наукових форумах. Зміст досліджень повно відображено в опублікованих роботах і в авторефераті. Таким чином, дисертація Ступчук Марії Сергіївни виконана на сучасному науковому рівні.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках програми НАН України «Функціональна геноміка, протеоміка та метаболоміка в системній біології» (державний реєстраційний номер 0112U001477), а також у рамках НДР відділу імунофізіології Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України «Дослідження клітинно-молекулярних механізмів імуноіндукованих розладів жіночої репродуктивної системи та корегуючого впливу наночастинок металів» (державний реєстраційний номер теми 0116U004471).

Структура і обсяг дисертації. Дисертація Ступчук Марії Сергіївни складається з анотації, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, основної частини (огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу результатів та їх обговорення, заключення), заключення, висновків, додатку і списку використаних джерел (228 найменувань).

Робота викладена на 143 сторінках машинописного тексту та проілюстрована 24 рисунками та 17 таблицями.

Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому. Дисертація Ступчук Марії Сергіївни є закінченим дослідженням і оформлено з дотриманням основних сучасних вимог, на належному технічному та методичному рівнях.

У першому розділі огляду літератури викладено сучасні уявлення про роль сиртуїнів у здійсненні жіночої репродуктивної функції (1.1), про вплив наночастинок срібла на жіночу репродуктивну систему (1.2), про експериментальні моделі ушкодження яєчників для дослідження аутоімунної патології яєчників у жінок (1.3). В кінці розділу подається узагальнення, яке підтверджує актуальність роботи.

На підставі даних літератури автором сформульовані мета і завдання дисертаційної роботи.

У другому розділі (матеріали і методи досліджень) представлено схема експерименту з умовами проведення дослідів і опис методів і речовин.

Досліди проводились із дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях, від 18.03.1986 р., Директиви ЄС №609 від 24.11.1986 р., Наказу МОЗ України №66 від 13.02.2006 р. та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 № 3447-IV.

Результати викладені в 5-ти розділах. У третьому розділі - дані про вплив активатора та інгібітора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах дії інгібітора аспартатних мітохондріальних переносників *in vitro* (3.1); про вплив активатора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах дії інгібітора NF-κB *in vitro* (3.2).

У четвертому розділі наведені дані про вплив активатора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах оксидативного стрес *in vitro* (4.1); про вплив активатора сиртуїнів та інгібітора NF-κB на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах оксидативного стресу *in vitro* (4.2).

У п'ятому розділі – дані про мейотичне дозрівання ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження (5.1); про життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження (5.2); про рівні експресії генів *COX2*, *Grem1* та *HAS2* у клітинах фолікулярного оточення ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження (5.3); про цілісність ДНК у ядрах клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження (5.4).

У шостому розділі представлені дані про вплив модуляторів сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження (6.1); про вплив модуляторів сиртуїнів на життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів мишей в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження (6.2); стосовно впливу модуляторів сиртуїнів на цілісність ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів мишей в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження (6.3).

У сьомому розділі наведені дані про вплив введення наночастинок срібла на функціональний стан яєчника (7.1); щодо впливу введення наночастинок срібла на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження (7.2); про вплив введення наночастинок срібла на пошкодження ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження (7.3).

Розділ 8 присвячено аналізу та узагальненню результатів проведених досліджень. Відповідно до структури попередніх п'яти розділів компактно і чітко за прийнятою схемою експериментів автор послідовно вбудовує отримані ним дані у відомості, які були отримані раніше з виділенням новизни власних даних у порівнянні з даними інших авторів.

У розділі «Заключення» подається схема функціонування клітин яєчника в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження.

Зауваження з оформлення та змісту дисертації. Як уже відзначено вище, дисертацію оформлено з дотриманням основних сучасних вимог, на належному технічному рівні. Все ж є деякі зауваження:

1. В роботі є дані, що в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження, відбуваються зміни у експресії генів *COX2*, *Grem1* та *HAS2* у клітинах фолікулярного оточення ооцитів, тоді як за умов введення наночастинок срібла, наприклад, такі дані відсутні, а вони були б цікавими і важливими.
2. Не коректно сформульований висновок №6 «Модулятори сиртуїнів в умовах моделювання ЕСАУ істотно задіяні у функціонуванні клітин яєчників та забезпечують протективний ефект НЧС на мейотичне дозрівання ооцитів і життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів», тому як друга частина висновку - за результатами роботи - не видається очевидною.
3. У підрозділі 3.2. «Вплив активатора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин ФОО за умов дії інгібітора NF-κB *in vitro*» - впливи активатора сиртуїнів - ресвератролу та інгібітора NF-κB - ВАУ 11-7082 є одно напрямленими - на мою думку, добре було б ще оцінити їх спільну дію на клітини яєчника.

Під час рецензування дисертаційної роботи виникли наступні **запитання**:

1. Чому для дослідження аутоімунного гломерулонефриту було використано модель ЕСАУ?
2. Чи може бути керованим вплив наночастинок срібла на регуляцію жіночої репродуктивної функції з метою поліпшення якості ооцитів і ембріонів?

Висловлені зауваження суттєво не впливають на загалом високу оцінку даної дисертації.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам. Згідно «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 р., вважаю, що за своєю актуальністю, науковою новизною, високим методичним рівнем, практичною значністю, об'ємом проведених досліджень, обґрунтованістю та вірогідністю зроблених висновків, а також за перспективами наукового і практичного застосування дисертаційна робота Ступчук Марії Сергіївни «Вплив модуляторів сиртуїнів та наночастинок срібла на функціонування клітин яєчника миші», відповідає всім вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня за фахом 03.00.13 - фізіологія людини і тварин.

Офіційний опонент

завідувач відділу проблем інтерферону та
імуномодуляторів Інституту мікробіології
і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
член-кореспондент НАН України,
заслужений винахідник України,
доктор біологічних наук,
професор

 Співак М.Я.



Співак М. Я.
Мож (Ковалю)