

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. Незважаючи на інтенсифікацію соціальних програм, спрямованих на збільшення народжуваності в Україні, ця проблема на сьогоднішній день залишається недостатньо вирішеною.

Серед новітніх підходів - запліднення *in vitro* (IVF) - широко прийнятий метод в разі безпліддя. Однак, його ефективність з частотою живонароджених на цикл, коливається в інтервалі від 13% до 28%. З огляду на несприятливі ефекти, такі як багатоплідна вагітність і синдром гіперстимуляції яєчників, можливість ускладнень і витрати, пов'язані з IVF, надзвичайно важливо шукати шляхи підвищення ефективності IVF. В рамках цієї проблеми визначення впливу модуляторів сиртуїнів та наночастинок срібла на функціонування клітин яєчника може бути основою розвитку фундаментального розуміння процесів формування якісного ооцита і правильного розвитку ембріона.

У пацієнтів-жінок з аутоімунним ураження нирок високо вірогідним є зменшення кількості і погіршення якості ооцитів в яєчнику, що може створювати проблеми при заплідненні аж до настання безпліддя, а також призводити до ускладнення процесу імплантації - тобто до нерезультативних циклів при застосуванні допоміжних репродуктивних технологій.

До сих пір, у більшості випадків точні причини аутоімунної патології яєчників залишаються невідомими, а кількість жінок з передчасною недостатністю яєчників, передчасним старінням яєчника і з аутоімунним оофоритом у всьому світі збільшується.

З огляду на це актуальними є дослідження з використанням експериментальних моделей на тваринах, метою яких є встановлення можливих механізмів розвитку безпліддя імунного походження.

У відділі імунофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАНУ протягом останніх 10-ти років активно вивчається аутоімунний розлад яєчників. У представленій роботі задіяна модель експериментального системного аутоімунного ушкодження яєчників. Це ушкодження (патент на корисну модель № 120418 / спосіб моделювання системного аутоімунного ушкодження у мишей // (№ 120418 від 25.10.2017, Бюл. № 20)) відтворювали шляхом імунізації тварин гомогенатом нирки.

Робота Ступчук М.С. присвячена вирішенню наукової задачі, яка до цих пір не була охарактеризованою, а мета роботи – чітко сформульована - оцінити впливи модуляторів сиртуїнів та наночастинок срібла (НЧС) на характеристики мейотичного дозрівання ооцитів, життєздатність та пошкодження ДНК у клітинах фолікулярного оточення ооцитів (ФОО) мишей.

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).

Наукова новизна одержаних результатів. Наукові та практичні результати проведених досліджень можна кваліфікувати як нове вирішення актуального наукового завдання.

Так, автором вперше показано, що інгібітор сиртуїнів нікотинамід змінює параметри життєздатності клітин клітин фолікулярного оточення ооцитів за рахунок його впливу на функціонування мітохондрії.

Встановлено, що в умовах оксидативного стресу транскрипційний фактор NF- κ B відіграє істотну роль у механізмі дії ресвератролу (активатор SIRT1) на процес мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів.

Дисертантом вперше показано, що в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження, яке досягається імунізацією самиць мишей 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 збільшується рівень первинних пошкоджень ДНК клітин фолікулярного оточення ооцитів.

Отримано нові дані про те, що в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження застосування активатора сиртуїнів ресвератролу (20 μ M) *in vitro* покращуються характеристики мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів, а також знижується кількість клітин ФОО із максимальним ступенем пошкоджень ДНК.

Автором вперше показано, що введення НЧС не впливає на ДНК клітин фолікулярного оточення ооцитів; в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження параметри мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин фолікулярного оточення ооцитів під дією НЧС покращуються, окрім цього зменшується ступінь пошкодження ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів.

Практичне значення одержаних результатів. Результати проведеного дослідження сприяють розширенню фундаментальних знань стосовно функціонального стану яєчника в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження.

Результати дослідження впливу ресвератролу та НЧС в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження на здатність ооцитів до мейотичного дозрівання можуть бути використані у випадках системних

імунних розладів і безпліддя, а також для удосконалення методик екстракорпоральних запліднень.

Таким чином, представлена робота послідовно розглядає нові аспекти сиртуїн-залежних механізмів регуляції репродуктивної функції. Більше того, логічна послідовність розгляду проблеми і представлення матеріалу підкреслює цілісність самої роботи і поглиблює її наукову значущість.

Ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків, сформульованих в дисертації, їх достовірність, повнота викладання в публікаціях. Дисертація Ступчук Марії Сергіївни виконана на сучасному науковому рівні. В роботі використані відповідні поставленим завданням методи з належною технікою проведення експериментів на тваринах. При кількісному аналізі і обробці результатів були використані сучасні статистичні методи. У підсумку це забезпечило можливість отримання, обробки та аналізу необхідного обсягу інформації. Проведено аналіз отриманих даних, який послуговував основою для висновків роботи. У сукупності, вищезгадане 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 міжнародних конференціях та з'їздах.

Всі положення дисертаційної роботи представлялися для обговорення на міжнародних і вітчизняних наукових форумах. Зміст досліджень повно відображено в опублікованих роботах і в авторефераті.

Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому. Дисертація Ступчук Марії Сергіївни є закінченим дослідженням; 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), висновків, списку використаних джерел (228 найменувань). Робота викладена на 144 сторінках машинописного тексту та проілюстрована 25 рисунками та 18 таблицями.

У першому розділі огляду літератури (займає 17 сторінок від 24 по 41) викладено сучасні уявлення про роль сиртуїнів у здійсненні жіночої репродуктивної функції, стосовно впливу наночастинок срібла на жіночу репродуктивну систему та щодо експериментальних моделей ушкодження яєчників для дослідження аутоімунної патології яєчників у жінок.

В кінці кожного з чотирьох підрозділів розділу вміщено коротке узагальнення, яке підкріплюється зверненням до актуальності роботи.

На підставі аналізу даних літератури обґрунтовані і сформульовані мета і завдання дисертаційної роботи. Завдань п'ять.

У другому розділі (матеріали і методи досліджень) коротко і досить повно представлено опис використовуваних методів і речовин, схема експерименту з умовами проведення дослідів і параметрами оцінювання.

Проведення експериментальних досліджень відповідають етичним і правовим вимогам.

Результати досліджень викладені в 5-ти розділах.

У третьому розділі представлені такі дані: в 3.1. представлені 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*; в 3.2. - дані про вплив активатора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах дії інгібітора NF-κB *in vitro*. Присутній підсумковий висновок в кінці розділу.

У четвертому розділі представлені дані про: в 4.1. - дані про вплив активатора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах оксидативного стресу *in vitro*; в 4.2. - дані 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*. Є підсумковий висновок в кінці розділу.

У п'ятому розділі представлені наступні дані: в 5.1. - про мейотичне дозрівання ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження; в 5.2. - дані щодо життєздатності клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження; в 5.3. - дані стосовно експресії генів *COX2*, *Grem1* та *HAS2* у клітинах фолікулярного оточення ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження; в 5.4. - оцінка цілісності ДНК у ядрах клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження. Підсумковий висновок в кінці розділу №5 - присутній.

У шостому розділі наведені дані про: в 6.1. - вплив модуляторів сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження; в 6.2. - дані про вплив модуляторів сиртуїнів на життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів мишей в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження; в 6.3. - стосовно впливу модуляторів сиртуїнів на цілісність ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів мишей в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження. Є підсумковий висновок в кінці розділу №6.

У сьомому розділі автор наводить дані про: в 7.1. - вплив введення наночастинок срібла на функціональний стан яєчника; в 7.2. - дані про вплив введення наночастинок срібла на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження; в 7.3. - щодо впливу введення наночастинок срібла на пошкодження ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження. Підсумковий ґрунтовний висновок в кінці розділу №7 також присутній.

Розділ 8 присвячений аналізу та узагальненню результатів. Тут - збережено послідовність і структуру попередніх п'яти розділів.

Читається не легко, проте є чітка та послідовна подача змін даних отриманих автором і виділення новизни власних даних в порівнянні з даними інших авторів.

У роботі також присутній розділ «Заключення». У цьому розділі (це одна сторінка) автор завершує формулювання власних положень на підставі отриманих даних.

Більше того, автором на основі власних результатів і з урахуванням літературних далі запропоновано «Вірогідну схему функціонування клітин яєчника в умовах ЕСАУ».

Зауваження з оформлення та змісту дисертації. Дисертацію оформлено з дотриманням основних сучасних вимог, на належному технічному рівні.

Все ж є такі зауваження:

1. Є зауваження до формулювання висновків. Так, на мою думку, висновок №1 – не зовсім вдалий, і тому пропоную такий варіант: «В умовах дії інгібітора сиртуїнів нікотінамідю відбувається пригнічення життєздатності клітин фолікулярного оточення ооцитів, мабуть, за рахунок його впливу на мітохондрії». Формулювання висновку №2 - дещо відрізняється від узагальнення за Розділом №4. Пропоную варіант: в умовах оксидативного стресу *in vitro* транскрипційний фактор NF-κB бере участь в механізмі дії ресвератролу на ооцити и клітини фолікулярного оточення ооцитів. До висновку №3 – можна було б додати величину (%) «істотного» зниження експресія гену *Grem1*, а у висновку №5 - через представлення відносних величин (%) уточнити слова «до помірного, але істотного покращення».
2. До огляду літератури можна було залучити більшу кількість ілюстрацій, це могло б вдало доповнити читання самого тексту.
3. Розділ «Заключення» видається зайвим, а його зміст можна було б додати до розділу №8 («Аналіз і узагальнення результатів»).

Проте, вважаю, що зроблені зауваження не знижують теоретичної та практичної цінності дисертації, та не впливають на позитивну оцінку дисертації Ступчук М.С. в цілому.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам. Згідно з пунктами 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 р. (зі змінами), вважаю, що за актуальністю, науковою новизною, методичним рівнем, теоретичною і практичною значимістю, об'ємом проведених досліджень, обґрунтованістю та вірогідністю зроблених узагальнень і 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 лабораторією імунології

ДУ «Інститут педіатрії, акушерства

і гінекології» НАМН України

доктор медичних наук, професор



Чернишов В.П.



Чернишов В.П.