

ВІДГУК
офіційного опонента на дисертаційну роботу
Грушки Наталії Георгіївни
«Механізми функціонування імунокомпетентних та оваріальних клітин
при активації імунної відповіді»
представлену на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук
за спеціальністю 03.00.13 - фізіологія людини і тварин

Актуальність дисертаційної роботи. На сучасному етапі розвитку біомедичної науки одним із пріоритетних напрямів фундаментальних досліджень є вивчення механізмів інтеграції імунної, ендокринної та нервової систем у підтриманні фізіологічного гомеостазу організму. Особливий інтерес становить дослідження нейроімуноендокринної регуляції репродуктивної функції, оскільки накопичені експериментальні та клінічні дані свідчать, що імунна система є важливим регулятором процесів фолікулогенезу, дозрівання ооцитів, овуляції та функціонування жовтого тіла. Водночас молекулярні механізми взаємодії між системною імунною відповіддю та локальними процесами в яєчнику залишаються недостатньо дослідженими, що обмежує можливості розроблення ефективних підходів до профілактики й лікування порушень жіночої репродуктивної функції.

Особливої актуальності ця проблема набуває у зв'язку зі зростанням поширеності хронічних запальних та аутоімунних захворювань, інфекційних процесів, широким застосуванням імунотерапії, а також необхідністю оцінки впливу системної активації імунної системи на репродуктивне здоров'я жінок. Відомо, що як оваріальне мікрооточення, так і ооцити, є надзвичайно чутливими до змін профілю медіаторів запалення та розвитку оксидативного стресу. Проте причинно-наслідкові зв'язки між активацією імунної відповіді, розвитком клітинного стресу, ушкодженням ДНК та порушенням функціонального стану клітин яєчника та якістю ооцитів залишаються недостатньо з'ясованими.

У цьому контексті дисертаційна робота Наталії Георгіївни Грушки, присвячена дослідженню молекулярних механізмів функціонування імунокомпетентних клітин і клітин яєчника за умов індукованої активації імунної відповіді, є своєчасною та актуальною. Запропонований автором комплексний підхід із використанням трьох експериментальних моделей імунної активації *in vivo* – введення бактеріального ліпополісахариду, конканаваліну А та гіперімунізації бичачим сироватковим альбуміном – дозволяє змодельовати різні патогенетичні варіанти системного запалення та здійснити порівняльний аналіз їх впливу на життєздатність і функції клітин імунної та репродуктивної систем. Це значно розширює фундаментальні уявлення про взаємозв'язок системних і локальних запальних процесів з патологічними змінами у репродуктивній системі. Таким чином, тема дисертаційної роботи є безперечно актуальною, а її виконання має важливе фундаментальне та практичне значення для розвитку сучасної імунофізіології та репродуктивної імунології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано у відділі імунофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України відповідно до планів науково-дослідної діяльності установи. Дослідження проводилися в межах низки фундаментальних науково-дослідних тем відділу, присвячених вивченню механізмів функціонування імунної системи, розвитку імуноопосередкованих порушень, їх впливу на репродуктивну систему та пошуку шляхів їх фармакологічної корекції, зокрема: «Вивчення механізмів розвитку імуноіндукованих запальних процесів в печінці і органах жіночої репродуктивної системи та шляхів їх корекції» (державний реєстраційний номер теми 0108U003914); «Дослідження молекулярно-генетичних та імунопатологічних механізмів функціональних порушень жіночої репродуктивної системи та можливостей їх корекції» (державний реєстраційний номер теми 0112U008233); «Дослідження клітинно-молекулярних механізмів імуноіндукованих розладів жіночої репродуктивної

системи та коригувального впливу наночастинок металів» (державний реєстраційний номер теми 0116U004471); «Роль аларміну амфотерину, сиртуїнів та наночастинок металів за умов імуноіндукованих розладів жіночої репродуктивної системи» (державний реєстраційний номер теми 0119U103964); «Механізми та шляхи корекції регульованої загибелі клітин імунної (тимуса і лімфатичних вузлів) та репродуктивної (яєчників і сім'яників) систем» (державний реєстраційний номер теми 0124U001370).

Тематика дисертаційної роботи повністю відповідає змісту зазначених науково-дослідних тем, є їх логічним продовженням та спрямована на вирішення актуальних фундаментальних і прикладних завдань сучасної фізіології та імунології.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Наукові положення, висновки та рекомендації, сформульовані в дисертаційній роботі, є достатньо обґрунтованими. Авторкою чітко визначено мету і завдання дослідження, які повністю відповідають темі роботи та послідовно реалізовані із застосуванням сучасних експериментальних підходів.

У першому розділі наведено ґрунтовний аналіз сучасної наукової літератури, що дозволив визначити актуальні проблеми, обґрунтувати напрям досліджень і сформулювати основні завдання дисертаційної роботи.

У другому розділі детально охарактеризовано матеріали, експериментальні моделі та комплекс сучасних фізіологічних, морфологічних, молекулярно-біологічних, біохімічних, цитологічних і статистичних методів дослідження, що забезпечило високий науково-методичний рівень роботи й достовірність одержаних результатів.

Третій, четвертий, п'ятий, шостий і сьомий розділи присвячено послідовному викладенню результатів власних експериментальних досліджень, виконаних із використанням моделей активації імунної відповіді, адекватних поставлених меті та завданням роботи. Це дозволило дисертантці отримати низку нових і важливих результатів, які логічно взаємопов'язані,

взаємно доповнюють один одного та дають змогу комплексно охарактеризувати особливості функціонування імунокомпетентних і оваріальних клітин за умов імуноопосередкованого ушкодження, а також оцінити ефективність окремих фармакологічних підходів до його корекції.

У розділі «Узагальнення результатів досліджень» авторкою здійснено критичний аналіз одержаних результатів та їх зіставлення з даними сучасної наукової літератури. Заслужують на позитивну оцінку системний підхід до інтерпретації результатів, логічність і належна обґрунтованість сформульованих наукових положень та висновків, що дозволило сформувати цілісне уявлення про досліджені механізми функціонування імунокомпетентних і оваріальних клітин за умов активації імунної відповіді.

Важливим завершальним елементом дисертаційної роботи є розроблена авторкою узагальнювальна блок-схема, яка інтегрує отримані результати в єдину концептуальну модель молекулярних механізмів самопідсилення імуноопосередкованого запалення. На схемі наочно продемонстровано взаємозв'язок між активацією імунної відповіді, розвитком оксидативного та генотоксичного стресу, активацією сигнальної осі ПАРП-1/HMGB1/NF- κ B, формуванням функціональних порушень імунокомпетентних і оваріальних клітин, а також визначено основні мішені їх фармакологічної корекції. Представлена схема вдало узагальнює основні положення дисертаційної роботи та підкреслює цілісність запропонованої авторкою концепції розвитку імуноопосередкованих порушень.

Наукова новизна одержаних результатів. Загальний аналіз змісту дисертаційної роботи свідчить про її системний, цілісний та завершений характер, високий науково-методичний рівень виконання і вагому наукову новизну одержаних результатів. Виконане дослідження суттєво розширює сучасні уявлення про механізми функціонування імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов надмірної активації імунної відповіді, а також про можливості фармакологічної корекції встановлених порушень.

Сформульовані у висновках дисертації положення містять суттєві елементи наукової новизни. Зокрема, вперше проведено комплексне порівняльне дослідження особливостей функціонування імунокомпетентних клітин за умов різних експериментальних моделей активації імунної відповіді. На моделі гіперімунокомплексемії; індукованої бичачим сироватковим альбуміном, встановлено особливості порушень функціонального стану оваріальних клітин та їх взаємозв'язок зі змінами в імунокомпетентних клітинах. Визначено закономірності розвитку оксидативних і генотоксичних змін, а також експериментально обґрунтовано ефективність застосування низки фармакологічних сполук для корекції виявлених порушень.

Вагомим концептуальним результатом є обґрунтування участі взаємопов'язаних сигнальних ланок PARP-1, HMGB1 та NF-κB у формуванні самопідсилювального механізму імуноопосередкованого ушкодження. Дисертаційне дослідження Н.Г. Грушки є, безперечно, однією з піонерських робіт, у якій основну увагу приділено вивченню ключових ланок партанатосу – особливого PARP-1-залежного типу регульованої клітинної загибелі, вперше описаного у 2006 році. Відомо, що партанатос лежить в основі загибелі клітин в експериментальних моделях інсульту, цукрового діабету, запалення та нейродегенеративних захворювань. Унікальність цього механізму клітинної загибелі полягає в можливості його фармакологічної регуляції за допомогою інгібіторів PARP-1, що відкриває перспективи для розроблення таргетних підходів до лікування широкого спектра патологічних станів запальної етіології, у т.ч. захворювань репродуктивної системи, зокрема передчасного виснаження яєчників.

Одержані результати не лише доповнюють наявні наукові дані, а й формують цілісне уявлення про взаємозв'язок між активацією імунної відповіді, розвитком оксидативного та генотоксичного стресу, порушеннями функціонального стану імунокомпетентних та оваріальних клітин і можливостями цілеспрямованого фармакологічного впливу на встановлені ланки цих процесів.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів.

Теоретичне та практичне значення дисертаційної роботи є вагомим і повною мірою відповідає рівню докторської дисертації. У теоретичному аспекті виконане дослідження істотно розширює сучасні уявлення про молекулярно-клітинні механізми імуноопосередкованого ушкодження клітин імунної та репродуктивної систем. Важливим науковим досягненням є інтеграція отриманих результатів у цілісну концепцію патогенетичних механізмів розвитку репродуктивних порушень за умов надмірної активації імунної відповіді, що має важливе значення для розвитку сучасної імунології, фізіології, патофізіології та репродуктивної медицини.

Практична значущість роботи визначається експериментальним обґрунтуванням нових підходів до фармакологічної корекції імуноопосередкованих порушень, визначенням перспективних молекулярних мішеней терапевтичного впливу, а також розробленням і апробацією експериментальних моделей для доклінічного тестування потенційних лікарських засобів. Встановлена можливість використання показників ушкодження ДНК імунокомпетентних клітин як перспективних непрямих маркерів імунозапальних порушень репродуктивної системи створює підґрунтя для розроблення нових діагностичних підходів. Впровадження результатів дослідження у наукову діяльність і навчальний процес закладів вищої освіти підтверджує їх практичну цінність. Сукупність отриманих результатів свідчить про вагомий внесок авторки у розвиток фундаментальної та прикладної біомедицини, а теоретична і практична значущість дисертаційної роботи не викликає сумнівів.

Повнота викладу основних результатів дисертації в опублікованих працях. Основні положення та результати дисертаційної роботи достатньою мірою висвітлені в наукових публікаціях авторки. За матеріалами дисертації опубліковано 62 наукові праці, з яких 15 статей у наукових виданнях, що індексуються у міжнародних наукометричних базах Scopus та Web of Science, 12 статей у фахових наукових виданнях України категорії «Б», 5 статей у

закордонних наукових виданнях та 30 тез доповідей, опублікованих у матеріалах наукових конференцій, конгресів і з'їздів різного рівня. Крім того, за результатами досліджень одержано 3 патенти України на корисну модель.

Оцінка мови та стилю дисертації. Дисертаційна робота побудована логічно й послідовно, має чітку структуру, що повністю відповідає меті та завданням дослідження. Матеріал викладено доступною науковою мовою з коректним використанням спеціальної термінології. Між розділами простежується чіткий логічний взаємозв'язок, а отримані результати належно проілюстровані числовим, табличним і графічним матеріалом, що сприяє їх сприйняттю та підтверджує обґрунтованість сформульованих висновків.

Відповідність реферату змісту дисертації та дотримання принципів академічної доброчесності. Аналіз змісту дисертації та реферату засвідчує їх повну відповідність. Реферат адекватно відображає основні наукові положення, результати дослідження, наукову новизну, теоретичне і практичне значення та висновки дисертаційної роботи і не містить інформації, відсутньої в основному тексті дисертації.

Дисертацію та реферат оформлено відповідно до чинних вимог до робіт, поданих на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук. Наукові положення, ідеї та результати інших авторів, використані в дисертаційній роботі, супроводжуються належними посиланнями на відповідні джерела.

Відповідність змісту дисертації спеціальності, за якою вона подається до захисту.

Опонована дисертаційна робота має комплексний характер і поєднує сучасні фізіологічні, імунологічні, молекулярно-біологічні та біохімічні підходи. Аналіз паспорта спеціальності 03.00.13 – фізіологія людини і тварин свідчить, що дисертація Грушки Наталії Георгіївни повністю відповідає спеціальності, за якою її подано до захисту.

Дискусійні положення та зауваження щодо змісту дисертації.

Відзначаючи високий науковий і методичний рівень дисертаційної роботи, її актуальність, новизну та практичну цінність, вважаю за доцільне висловити окремі зауваження та поставити низку дискусійних запитань.

Зауваження:

1. Назва розділу методів 2.1 не зовсім коректна, оскільки лабораторні тварини, описані у ньому, не є об'єктом дослідження.
2. У розділі 2.6 доцільно було зазначити спосіб виготовлення відбитків органів, а також формулу розрахунку депонування імунних комплексів у тканинах в умовних одиницях за 5-бальною шкалою.
3. У методичному розділі 2.13. «Використані речовини» перелік фармакологічних сполук, які тестувалися щодо корекції імуноопосередкованих порушень, не варто було об'єднувати з барвниками та індукторами імунної відповіді. Доцільно було сформулювати їх в окремий підрозділ. Індуктори було достатньо описати у відповідних підрозділах, що описують моделі.
4. Назва розділу 2.14. «Загальна схема експерименту» є не зовсім вдалою, оскільки не описує загальну схему одного експерименту. Описи підрозділів розділу 2.14 частково дублюють описи підрозділів розділу 2.2. Для полегшення сприйняття схем дослідів доцільно було зробити власне схеми із зазначенням таймлайну проведених маніпуляцій та кількості тварин у кожній групі.
5. Статистичний аналіз результатів дослідження сполук для фармакологічної корекції імуноопосередкованих ушкоджень клітин був би більш інформативним із застосуванням двофакторного ANOVA.
6. При описі запалення, перекисного окиснення ліпідів або генотоксичного стресу за умов моделювання імунокомплексного ушкодження стилістично невдало і не зовсім коректно зазначати, що ці процеси відбуваються «під дією БСА», оскільки сам по собі БСА не чинить, наприклад, генотоксичної

- дії, і автор своїми результатами доводить, що зазначені патологічні процеси асоційовані з депонуванням у тканинах та циркуляцією імунних комплексів.
7. У таблицях, на рисунках та підписах до них доцільно зазначати кількість тварин у групах.
 8. У роботі зустрічаються окремі термінологічні неточності. Так, використання терміна «імунокомпетентний орган» не повною мірою відповідає сучасній професійній термінології. Більш коректними є терміни «лімфоїдні органи» або «органи імунної системи».

Запитання:

1. У чому полягають особливості і переваги розробленої авторським колективом корисної моделі імунокомплексного ушкодження, індукованого бичачим сироватковим альбуміном (БСА), порівняно з описаною в літературі моделлю сироваткової хвороби у мишей, індукованої БСА? Чи придатний для моделювання системного імунокомплексного ушкодження катіонний БСА?
2. Чому в роботі не використовували визначення вагових індексів лімфоїдних органів, адже, зокрема, спленомегалія є релевантним маркером гіперімунокомплексемії, а інволюція тимусу – маркером стрес-індукованої імуномодуляції?
3. Який, на думку автора, з імовірних механізмів пошкодження ДНК в лімфоїдних органах та органах репродуктивної системи за умов імунокомплексемії вносить найбільш вагомий внесок: токсична дія активних форм кисню, цитокін-індукована геномна нестабільність чи реплікаційний стрес?
4. У роботі досліджено три з чотирьох критеріїв для оцінки клітинної загибелі шляхом партанатосу: гіперактивація PARP-1, ушкодження ДНК та експресія HMGB1. Чому не аналізували ядерну транслокацію апоптоз-індукувального фактора (AIF)?

Висловлені зауваження не стосуються концепції дослідження, не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи та не знижують її наукового рівня, а також теоретичного і практичного значення. Поставлені запитання мають дискусійний характер.

Загальний висновок та оцінка дисертаційної роботи. Дисертаційна робота Грушки Наталії Георгіївни на тему «Механізми функціонування імунокомпетентних та оваріальних клітин при активації імунної відповіді» є самостійним завершеним науковим дослідженням, виконаним на високому науково-методичному рівні.

У роботі отримано комплекс нових наукових результатів, які суттєво розширюють і поглиблюють сучасні уявлення про механізми функціонування імунокомпетентних клітин за різних моделей активації імунної відповіді, а також оваріальних клітин за умов експериментальної гіперімунокомплексемії. На підставі проведених досліджень авторкою запропоновано цілісну концептуальну модель механізмів самопідсилення імуноопосередкованого запалення, яка інтегрує молекулярні та клітинні ланки його розвитку та визначає основні мішені фармакологічної корекції.

Актуальність обраної теми, належний науково-методичний рівень виконаних досліджень, обґрунтованість наукових положень і висновків, достовірність та наукова новизна одержаних результатів, їх теоретичне і практичне значення свідчать про високий рівень виконаної роботи та наукову зрілість авторки. Матеріали дисертації належним чином апробовано на наукових форумах, а основні результати повно висвітлено у профільних наукових виданнях. Отримані результати забезпечують розв'язання важливої наукової проблеми, пов'язаної зі встановленням механізмів функціонування імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов активації імунної відповіді, що має істотне значення для розвитку фізіології людини і тварин та суміжних медико-біологічних наук. Висновки сформульовано чітко, логічно, належним чином обґрунтовано та повністю узгоджено з результатами дослідження.

11