

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. Активація імунної відповіді є важливим фізіологічним механізмом захисту, що спрямований на розпізнавання та усунення потенційно небезпечних чинників і підтримання гомеостазу. Однак, надмірна або тривала активація імунних реакцій може призводити до дисбалансу у регуляції імунної відповіді, посилення продукції прозапальних цитокінів і розвитку оксидативного стресу. Такі зміни погіршують не лише функціонування імунної системи, але й пригнічують специфічні функції клітин інших органів і тканин, зокрема репродуктивної системи.

Збереження структурної та функціональної цілісності клітин є необхідною передумовою її нормальної життєдіяльності. За умов надмірної активації імунної відповіді клітини зазнають дії прозапальних медіаторів, активних форм кисню, що зумовлює активацію систем антиоксидантного захисту, репарації ДНК та інших механізмів відновлення ушкоджень. Все це разом, пригнічує компенсаторні можливості та може індукувати незворотні зміни, що супроводжуються порушенням функціональної активності, накопиченням ушкоджень ДНК та активацією програмованої загибелі клітин. Саме тому з'ясування молекулярних і клітинних механізмів змін функціонального стану імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов надмірної активації імунної відповіді є актуальним і науково значущим.

Одним із важливих компонентів клітинної відповіді на ушкодження ДНК є полі(АДФ-рибозо)полімераза-1 (ПАРП-1). Цей фермент бере участь у підтриманні геномної стабільності, регуляції процесів репарації ДНК та визначенні подальшої долі клітини після ушкодження її генетичного матеріалу. Разом із тим надмірна активація ПАРП-1 за умов оксидативного стресу може сама стати чинником розвитку клітинної дисфункції через значні витрати метаболічної енергії на синтез полі-АДФ-рибози, виснаження ресурсів клітини та активацією ПАРП-1-залежних шляхів клітинної загибелі. Особливо актуальним питанням залишається пошук дієвих інгібіторів для модулювання активності ПАРП-1, оскільки така активність значною мірою пов'язана зі збереженням цілісності ДНК, енергетичного гомеостазу та життєздатності клітин.

За умов надмірної активації імунної відповіді посилена продукція активних форм кисню, оксиду азоту та прозапальних медіаторів сприяє розвитку оксидативного стресу, порушенню стабільності геному і змінам функціонального стану клітин. Проте більшість досліджень присвячена окремим аспектам цих процесів, тоді як закономірності розвитку генотоксичних змін у різних клітинних популяціях, насамперед в імунокомпетентних та оваріальних клітинах, їх взаємозв'язок із порушеннями функціонального стану, а також можливості фармакологічної корекції досі залишаються недостатньо з'ясованими. Саме тому комплексне дослідження, виконане Н.Г. Грушкою, є актуальним і важливим з огляду сучасних стратегій підтримки репродуктивної функції. У роботі проаналізовані механізми індукції ушкоджень ДНК за різних моделей активації імунної відповіді, розкриті взаємозв'язки порушень функціонального стану імунокомпетентних та оваріальних клітин. На особливу увагу заслуговує той факт, що авторкою оцінено ефективність застосування фармакологічних агентів із цитопротекторними властивостями, здатних впливати на окремі ланки індукції клітинних ушкоджень. Такий підхід розширює уявлення про молекулярно-

клітинні механізми розвитку імуноопосередкованих порушень та обґрунтовує можливі напрями їх фармакологічної корекції.

Відповідно до поставленої мети авторкою сформульовано та послідовно вирішено взаємопов'язані у логічний ланцюг завдання, зокрема: відтворено експериментальні моделі імуноопосередкованого ушкодження із залученням різних ланок імунної відповіді; досліджено механізми розвитку генотоксичного стресу та порушення структурної цілісності ДНК в імунокомпетентних й оваріальних клітинах; визначено роль ПАРП-1, HMGB1 і NF-κB у реалізації клітинної відповіді на ушкодження; оцінено функціонально-метаболічний стан клітин та особливості апоптичної і некротичної загибелі за умов оксидативного стресу; експериментально обґрунтовано дієвість застосування інгібіторів ПАРП-1 та сполук із цитопротекторними, антиоксидантними й протизапальними властивостями для корекції виявлених порушень.

Для виконання поставлених завдань авторкою застосовано комплекс сучасних фізіологічних, морфологічних, молекулярно-біологічних, імунологічних, біохімічних та фармакологічних методів дослідження. Обрані методичні підходи є адекватними поставленій меті, взаємно доповнюють один одного та дозволили детально дослідити механізми генерації імуноопосередкованого ушкодження, оцінити стан інтегральної цілісності ДНК, активність ПАРП-1 і NF-κB, а також, ефективність засобів фармакологічної корекції.

Зв'язок дисертаційної роботи з державними та галузевими науковими програмами. Дисертаційна робота виконана у відділі імунофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України в межах таких фундаментальних науково-дослідних робіт: «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 можливості їх корекції» (державний реєстраційний номер теми 0112U008233); «Дослідження клітинно-молекулярних механізмів імуноіндукованих розладів жіночої репродуктивної системи та коригуючого 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).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота має відповідну рекомендаціям МОН структуру і складається з анотації, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», п'яти розділів власних експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків і списку використаних джерел. Роботу викладено на 421 сторінці друкованого тексту, ілюстровано 74 рисунками та представлено 13 таблиць.

В огляді літератури узагальнено відомості вітчизняних і зарубіжних досліджень щодо механізмів розвитку імуноопосередкованих ушкоджень і генотоксичного стресу, ролі ПАРП-1, NF-κB та HMGB1, значення оксидативних процесів, а також підходів до цитопротекторної й антиоксидантної корекції порушень функціонального стану клітин. Наведені дані дають змогу визначити недостатньо досліджені аспекти проблеми та обґрунтувати вибір напрямку дисертаційної роботи.

У розділі «Матеріали та методи дослідження» наведено детальний опис експериментальних моделей, використаних методичних підходів та способів статистичної обробки одержаних даних. Застосований комплекс методів дозволив оцінити критичні складові, які забезпечують функціональний стан клітин, зокрема, причинно-наслідкові зв'язки та особливості розвитку генотоксичних змін, процесів апоптозу і некрозу, активність ПАРП-1 та NF-

кВ. Поєднання фізіологічних, морфологічних, молекулярно-біологічних, імунологічних та біохімічних методів відповідає меті й завданням дослідження.

Основний зміст дисертації викладено у п'яти розділах, у яких послідовно представлено результати власних досліджень. Усі представлені розділи логічно пов'язані між собою: від оцінки функціонально-метаболических змін за різних моделей активації імунної відповіді до з'ясування молекулярно-клітинних механізмів порушення функціонального стану імунокомпетентних та оваріальних клітин і експериментального обґрунтування можливостей їх фармакологічної корекції.

Матеріал дисертації викладено в достатньо повній мірі з логічною послідовністю усіх складових. Результати експериментальних досліджень належним чином проаналізовано, зіставлено з наявними літературними даними та узагальнено в окремому розділі. Сформульовані висновки повністю відповідають поставленим завданням і відображають основні результати роботи.

Наукове значення та новизна дисертаційної роботи. Дисертаційна робота Н.Г. Грушки містить низку нових фундаментальних результатів, які суттєво поглиблюють сучасні уявлення про молекулярно-клітинні механізми розвитку імуноопосередкованого ушкодження. Наукова новизна роботи полягає у з'ясуванні ролі порушень інтегральної цілісності ДНК, ПАРП-1-залежних сигнальних механізмів, апоптотичної та некротичної загибелі клітин у розвитку функціональних порушень імунної та репродуктивної систем, а також в експериментальному обґрунтуванні можливостей їх фармакологічної корекції.

Важливою особливістю дисертаційної роботи є те, що авторка не обмежилася констатацією окремих клітинних змін, а встановила закономірні зв'язки між ушкодженням ДНК, активацією досліджуваних сигнальних механізмів і порушеннями функціонального стану імунокомпетентних та оваріальних клітин, а також, експериментально оцінила можливості

фармакологічної корекції виявлених порушень. З огляду на широке коло представлених даних, найбільш вагомими науковими результатами дисертації є:

- авторкою вперше встановлено участь ПАРП-1-залежних механізмів у розвитку імуноопосередкованого ушкодження імунокомпетентних та оваріальних клітин. Показано взаємозв'язок між активацією ПАРП-1, порушенням інтегральної цілісності ДНК та пригніченням мейотичного дозрівання ооцитів, а також встановлено, що фармакологічне інгібування ПАРП-1 зменшує вираженість виявлених порушень;
- науковий інтерес становлять результати порівняльного дослідження трьох моделей імуноопосередкованого ушкодження, індукованих введенням БСА, КонА та ЛПС. Показано, що ці моделі, які відтворюють відповідно імунокомплексний, переважно Т-клітинно-опосередкований та ендотоксин-індукований механізми активації імунної відповіді, супроводжуються розвитком генотоксичного стресу, зокрема, порушенням інтегральної цілісності ДНК імунокомпетентних клітин тимуса і лімфатичних вузлів. Водночас, характер виявлених змін залежав від механізму імунної активації: за умов КонА-індукованого ушкодження вони охоплювали ширший спектр класів ДНК-комет;
- одержано нові дані, які свідчать про участь сигнального каскаду ПАРП-1/HMGB1/NF-κB у розвитку клітинного ушкодження. Показано, що цитопротекторний ефект інгібітора ПАРП-1 4-гідроксиквіназоліну супроводжується зниженням генерації активних форм кисню, пригніченням вивільнення HMGB1, активації NF-κB, зменшенням ушкодження ДНК та інтенсивності клітинної загибелі;
- важливим результатом є встановлений авторкою зв'язок між розвитком генотоксичного стресу та порушенням функціонального стану клітин репродуктивної системи за умов БСА-індукованого імунокомплексного ушкодження. Показано, що ушкодження ДНК в оваріальних клітинах супроводжується пригніченням мейотичного дозрівання ооцитів, посиленням

апоптотичних і некротичних процесів, а також зниженням експресії мРНК генів HAS2, COX2 і GREM1 у кумулюючих клітинах;

- практична цінність роботи підтверджується результатами експериментальної оцінки цитопротекторної дії інгібіторів ПАРП-1, кверцетину, етилметилгідроксипіридину сукцинату, наночастинок срібла та цитрату германію. Залежно від експериментальної моделі їх застосування сприяло зменшенню генотоксичного стресу та клітинної загибелі, збереженню життєздатності імунокомпетентних і оваріальних клітин, а також поліпшенню показників мейотичного дозрівання ооцитів.

Загалом, отримані результати безперечно мають важливе фундаментальне та практичне значення, оскільки розширюють сучасні уявлення про взаємопов'язані механізми за участю ПАРП-1, HMGB1 та NF- κ B у розвитку імуноопосередкованого ушкодження, свідчать про зв'язок порушення інтегральної цілісності ДНК зі змінами функціонального стану клітин імунної та репродуктивної систем, а також експериментально обґрунтовують можливість фармакологічної корекції виявлених порушень шляхом застосування різних за механізмами дії цитопротекторних агентів.

Практичне значення результатів дисертації. Практична цінність дисертаційної роботи полягає насамперед в експериментальному обґрунтуванні системного підходу до оцінки та фармакологічної корекції клітинних порушень, що виникають за умов надмірної активації імунної відповіді. Отримані авторкою результати не лише поглиблюють сучасні уявлення про механізми розвитку генотоксичного стресу, а й визначають перспективні молекулярно-клітинні мішені для цитопротекторного впливу, спрямованого на збереження інтегральної цілісності ДНК, обмеження ПАРП-1-залежних механізмів клітинної загибелі та підтримання життєздатності і функціональної активності клітин.

Особливе практичне значення має встановлений авторкою взаємозв'язок між ступенем ушкодження ДНК та змінами функціонального стану імунокомпетентних і оваріальних клітин. Це дає підстави розглядати

показники інтегральної цілісності ДНК як інформативні критерії оцінки вираженості імуніопосередкованого клітинного ушкодження та ефективності його фармакологічної корекції. Одержані дані створюють наукове підґрунтя для подальшого розроблення діагностичних і прогностичних підходів до оцінки порушень функціонального стану репродуктивної системи, пов'язаних з активацією імунної відповіді.

Важливе практичне значення мають сформований комплекс експериментальних моделей та розроблена система критеріїв оцінювання імуніопосередкованого ушкодження, що охоплює показники цілісності ДНК, життєздатності клітин, апоптотичної та некротичної загибелі, оксидативного стресу, активності сигнальних механізмів і функціонального стану оваріальних клітин. Запропонований комплекс методичних підходів може бути використаний у доклінічних дослідженнях для оцінювання ефективності потенційних цитопротекторних, антиоксидантних та імунотимізуювальних засобів.

Результати щодо ефективності інгібіторів PARP-1, кверцетину, етилметилгідроксипіридину сукцинату, наночастинок срібла та цитрату германію обґрунтовують перспективність фармакологічного впливу на окремі ланки генотоксичного, оксидативного та прозапального ушкодження клітин. Одержані дані створюють експериментальну основу для подальшого розроблення способів профілактики та корекції імуніопосередкованих порушень функціонального стану клітин імунної та репродуктивної систем.

Результати дисертаційної роботи становлять інтерес для фахівців у галузі фізіології, патофізіології, клітинної біології, імунології та репродуктивної медицини. Сформульовані в роботі положення стосовно взаємозв'язку генотоксичного стресу, клітинної загибелі та функціональних порушень можуть бути використані при плануванні фундаментальних і прикладних досліджень, а також у навчальному процесі під час викладання дисциплін біологічного й медичного профілю.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень. Високий ступінь обґрунтованості отриманих результатів, сформульованих наукових положень та висновків забезпечується чітко визначеною метою дослідження, логічною побудовою експериментальної роботи, використанням адекватних, різних за механізмами розвитку моделей імуноопосередкованого ушкодження та сучасних взаємодоповнювальних методів дослідження.

Для вирішення поставлених завдань авторкою застосовано комплекс фізіологічних, молекулярно-біологічних, морфологічних, біохімічних, імунологічних і фармакологічних методів, що дозволило всебічно оцінити розвиток генотоксичного стресу, порушення інтегральної цілісності ДНК, особливості ПАРП-1-залежних механізмів клітинної відповіді, апоптотичної та некротичної загибелі клітин, а також ефективність фармакологічної корекції виявлених порушень. Усі застосовані методи є повністю адекватними завданням дослідження.

Отримані результати є внутрішньо узгодженими, взаємно доповнюють один одного та підтверджуються застосуванням кількох незалежних методичних підходів. Достовірність отриманих даних забезпечується також достатнім обсягом експериментального матеріалу та наявністю відповідних контрольних груп. Аналіз експериментального матеріалу проведено із використанням адекватних методів статистичної обробки, а сформульовані авторкою висновки логічно випливають із наведених результатів досліджень.

Загалом, достовірність наукових положень, висновків і практичних рекомендацій, сформульованих у дисертаційній роботі, не викликає сумніву.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях. Основні результати дисертаційної роботи достатньо повно висвітлені у наукових публікаціях авторки. За темою дисертації Грушкою Н.Г. опубліковано 62 наукові праці, серед яких 15 статей у виданнях, що індексуються міжнародними наукометричними базами Scopus та Web of Science (у тому числі 2 статті у виданнях квартилю Q2, 3 – Q3, 9 – Q4 та 1 стаття у виданні, що на момент публікації індексувалося у Scopus без визначеного квартиля), 12

статей у фахових наукових виданнях України категорії «Б», 5 статей у зарубіжних наукових виданнях, не індексованих у Scopus та Web of Science, а також 30 тез доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних наукових конгресів, з'їздів і конференцій. Крім того, Грушка Н.Г. є співавтором трьох патентів на корисну модель, одержаних за результатами досліджень, пов'язаних із тематикою дисертаційної роботи. Зміст опублікованих праць відображає основні наукові положення й результати дисертації, їх новизну та практичну спрямованість.

Оцінка мови і стилю дисертації. Дисертаційна робота написана грамотною науковою мовою, має чітку логічну побудову та послідовний виклад матеріалу. Опис результатів досліджень є аргументованим, а наведені ілюстративні матеріали сприяють кращому сприйняттю та аналізу отриманих експериментальних даних.

Наукову термінологію використано коректно й послідовно, стиль викладу відповідає вимогам, установленим для докторських дисертацій. Принципових зауважень до мови, стилю викладу та оформлення дисертаційної роботи немає.

Відповідність змісту дисертації спеціальності, за якою дисертаційна робота подається до захисту. Опонована дисертаційна робота є мультидисциплінарним дослідженням, у якому поєднано сучасні підходи фізіології, клітинної біології, імунології, молекулярної біології, біохімії, репродуктивної фізіології, морфології та експериментальної фармакології. Такий комплексний підхід дозволив авторці всебічно дослідити механізми розвитку імуноопосередкованого ушкодження, порушення інтегральної цілісності ДНК, ПАРП-1-залежні механізми клітинної відповіді та шляхи їх фармакологічної корекції.

Аналіз змісту дисертаційної роботи, її мети, поставлених завдань, використаних методів дослідження та отриманих результатів свідчить, що дисертація Н.Г. Грушки повністю відповідає паспорту спеціальності **03.00.13 – фізіологія людини і тварин**, за якою вона подана до захисту.

Оцінка змісту дисертації, її завершеності та дотримання принципів академічної доброчесності. Дисертаційна робота є завершеним самостійним науковим дослідженням, у якому отримано нові науково обґрунтовані результати, що мають важливе значення для розвитку сучасної фізіології, клітинної біології та експериментальної медицини. Матеріал викладено послідовно, висновки логічно випливають із результатів досліджень, а сформульовані наукові положення є достатньо аргументованими.

Ознайомлення зі звітом щодо перевірки дисертаційної роботи на текстові збіги свідчить про відсутність ознак академічного плагіату. За результатами аналізу змісту дисертаційної роботи ознак фабрикації чи фальсифікації результатів дослідження не виявлено.

Зауваження, побажання, дискусійні питання. Так само як і будь-яке фундаментальне експериментальне дослідження, дисертаційна робота Н.Г. Грушки викликає низку наукових дискусійних питань, які не знижують її загальної позитивної оцінки, однак потребують уточнення.

1. Одним із центральних положень дисертації є встановлення важливої ролі ПАРП-1 у механізмах розвитку імуноопосередкованого ушкодження. Разом із тим цікаво було б почути думку авторки щодо можливої участі інших представників родини полі(АДФ-рибозо)полімераз у реалізації клітинної відповіді на ушкодження ДНК та їх потенційного внеску у виявлені зміни.

2. У роботі продемонстровано цитопротекторні ефекти інгібіторів ПАРП-1, антиоксидантних і наноструктурованих сполук щодо зменшення ушкодження ДНК та клітинної загибелі. Які механізми, на думку авторки, мають провідне значення для різних груп досліджених речовин: безпосередній вплив на ПАРП-1-залежні процеси і репарацію ДНК чи опосередкована дія через зниження інтенсивності оксидативного стресу та прозапальної відповіді?

3. Чому саме 3-амінобензамід та 4-гідроксиквіназолін як інгібітори ПАРП-1 були досліджені у ролі цитопротекторних агентів? Наприклад,

олапариб є широко досліджуваним інгібітором з добре відомим механізмом стосовно пригнічення активності ПАРП.

4. NF-κB це родина транскрипційних факторів які забезпечують важливі сигнальні шляхи і клітинну відповідь, включаючи продукцію цитокінів. Чи можна пояснити чому в роботі досліджували одного представника цієї родини – NF-κB p65?

5. Враховуючи представлені результати дослідження чи можна передбачити існування певних механізмів, які опосередковують ефекти інгібіторів ПАРП-1 на зниження рівня активації NF-κB і відповідно пригнічення запального процесу?

6. Отримані результати свідчать про односпрямовані зміни інтегральної цілісності ДНК в імунокомпетентних та оваріальних клітинах за умов імуноопосередкованого ушкодження. Чи можна, на думку авторки, розглядати показники ушкодження ДНК в імунокомпетентних клітинах як потенційні непрямі індикатори змін у репродуктивній системі та які додаткові дослідження необхідні для підтвердження такого припущення?

7. Які механізми дії наночасток у представленому дослідженні можуть бути, на думку авторки, найбільш дієвими стосовно захисту від імуноопосередкованих ушкоджень ДНК?

Висловлені питання, зауваження та побажання мають переважно дискусійний характер і жодним чином не знижують наукової цінності дисертаційної роботи. Вважаю, що виконане дослідження є завершеною фундаментальною працею, яка поєднує сучасні підходи клітинної фізіології, молекулярної біології, імунології та репродуктивної біології, а наведені зауваження не впливають на її загальну високу оцінку.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Грушки Наталії Георгіївни «Механізми функціонування імунокомпетентних та оваріальних клітин при активації імунної відповіді», подана на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин, є завершеним

фундаментальним науковим дослідженням, у якому отримано нові науково обґрунтовані результати, що мають важливе значення для розвитку сучасної фізіології, клітинної біології, молекулярної медицини та репродуктивної біології.

Враховуючи актуальність дисертаційного дослідження, належний методичний рівень та обсяг проведених досліджень, їх новизну, теоретичне і практичне значення отриманих результатів, вважаю, що дисертаційна робота Грушки Наталії Георгіївни відповідає вимогам пунктів 7, 8 та 9 Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 року № 1197, а її авторка заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук, професор,

професор кафедри фізіології,

біохімії тварин та лабораторної діагностики,

заступник директора з наукової роботи НДЦ

«Biosafety Center»

Дніпровського державного аграрно-економічного університету

Віктор НЕДЗВЕЦЬКИЙ

10 серпня 2026 р.

Підпис
Завідує Начальник ВК ДДАЕУ
«08» 20.26.2026

