

**ВІДГУК**

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Насібян Ліліт Седраківни

«Механізм дії пептидоглікану золотистого  
стафілококу на скоротливість міометрія щурів»,

що подана до спеціалізованої вченої ради Д26.198.01  
при Інституті фізіології імені О.О. Богомольця для здобуття  
наукового ступеня  
кандидата біологічних наук за спеціальністю

03.00.13 - фізіологія людини і тварин

**Актуальність теми дисертації**

Дисертація Насібян Ліліт Седраківни «Механізм дії пептидоглікану золотистого стафілококу на скоротливість міометрія щурів», що подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, спрямована на дослідження механізмів дії пептидоглікану золотистого стафілококу на скоротливість міометрія щурів.

Пептидоглікан (ПГ) – це структурний компонент клітинної стінки грампозитивних та грамнегативних бактерій, що оточує зовні клітинну мембрану бактерії. ПГ виділяється в навколишнє середовище, розноситься кровопливом та осідає на тропних клітинах, де з часом ініціює патологічні процеси. Персистенція пептидоглікану в генітальному тракті під час вагітності пов'язана з акушерськими та перинатальними ускладненнями, насамперед зі стимуляцією маткової скоротливості та перериванням вагітності. Вплив пептидоглікану поза вагітністю достатньо не вивчений, але при масштабних дослідженнях було виявлено стафілококоносійство генітального тракту жінок з

безпліддям. ПП золотистого стафілококу може бути патогенетичним фактором безпліддя, внаслідок порушення характеру скоротливості матки таким чином, що запліднення, або імплантація плідного яйця стають неможливими. Вивчення механізму дії ПП на скоротливість міометрію дозволить зрозуміти деякі патофізіологічні порушення репродуктивної системи жінок. В роботі Насібян Л.С. вперше описані амплітудно-кінетичні параметри скорочень міометрія вагітних та невагітних щурів на тлі дії ПП (пептидоглікану). Також була встановлена залежність ефекту ПП на маткову скоротливість від екстрогену та прогестерону. Показано взаємозв'язок пептидоглікану з кальцієвою сигналізацією ГМК міометрія та активністю аденілатциклазної системи.

Сукупність наведених результатів дозволяє охарактеризувати їх як такі, що є новими. В зв'язку з цим можна упевнено сказати, що ця дисертаційна робота є актуальним дослідженням, присвяченим важливій науковій проблемі - дослідженню механізмів дії пептидоглікану золотистого стафілококу на скоротливу активність міометрія щурів.

**Зв'язок теми дисертації з державними, галузевими науковими програмами.**

Роботу виконано в рамках наукової тематики відділу нервовом'язової фізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Фармакологічна модуляція механізмів збудження - гальмування гладеньких м'язів у нормі та патології» (№ держреєстрації 01 10U004758) та клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (№ держреєстрації 01 13U007273).



**Обґрунтованість положень, висновків, рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність і новизна, повнота викладення в опублікованих роботах.**

Дисертаційна робота Л.С. Насібян є повноцінною науковою, завершеною працею. Дисертація характеризується розкриттям досліджуваної проблеми, самостійністю у підходах до їх висвітлення, ґрунтовною практичною перевіркою отриманих результатів, їх суттєвою теоретичною та практичною значущістю. Автор детально проаналізував сучасний стан проблеми, сформулював проблематику з досліджень механізмів дії пептидоглікану золотистого стафілококу на скоротливу активність міометрія щурів. Для виконання поставлених задач автором було використано сучасні методики експериментального матеріалу.

Експерименти проводилися на смужках ГМ та ізольованих ГМК міометрія статевозрілих самиць щурів лінії Wistar., та вагітних щурах в терміні 8-11 днів гестації. Скоротливу активність міометрія досліджували методом тензометрії в ізометричному режимі, суть якого полягає в вимірі сили м'язової смужки в умовах ізометричного скорочення. Запис скоротливої активності проводили через аналогово-цифровий перетворювач на комп'ютер. Чітко визначені і показані графічно основні параметри скоротливої здатності гладеньких м'язів матки під впливом на неї пептидоглікану. Ізолювання гладеньком'язових клітин (ГМК) міометрія вагітних і невагітних щурів здійснювалось ферментативним методом двоциклової обробки тканини, який є доступним методом ферментативного аналізу. Для візуалізації змін  $\text{Ca}^{2+}$  на субклітинному рівні використовували конфокальний комплекс LSM 5 PASCAL на

основі інвертованого мікроскопа Axiovert 200 M (Zeiss). Доцільно показана залежність ефекту пептидоглікану на скоротливу активність міометрія щурів від естрогену та прогестерону.

В ході експерименту використовувалися моделі гіперестрогенії та «псевдовагітності» у щурів. Дія пептидоглікану виявлялася в статистично достовірному збільшенні і амплітуди, і тривалості, і частоти спонтанних скорочень міометрія.

Доведена участь Gi/0-білку в реалізації ефекту ПГ. ПГ взаємодіє з Gi/0-білком, що інгібує фермент аденілатциклазу та перешкоджає утворенню цАМФ, яка є одним з основних регуляторів маткового скорочувального акту. Використані коректні методи статистичної обробки даних, що дало можливість сформулювати адекватні висновки стосовно механізмів дії пептидоглікану золотистого стафілококу на скоротливу активність міометрія щурів.

В основу аналізу отриманих результатів автор поклав сучасні дослідження в галузі патофізіології, біохімії, акушерства і гінекології. На основі найбільш значущих наукових положень дисертаційної роботи сформульовані висновки, зміст яких повністю відповідає завданням дослідження і отриманим результатам.

Винесені на захист положення ґрунтуються на аналізі матеріалів власних досліджень, володіють науковою новизною.

Достовірність результатів не викликає ніяких сумнівів. В роботі вперше запропонована та експериментально обґрунтована гіпотеза про здатність ПГ (пептидоглікану) золотистого стафілококу модулювати скоротливість вагітного і невагітного міометрія за умов відсутності ендометрія, а не тільки опосередковано через



протизапальні цитокіни, що секретуються в ендометрії або децидуальній тканині, як вважалося раніше. В ході роботи були вперше описані амплітудно-кінетичні параметри скорочень міометрія вагітних та невагітних щурів на тлі дії ПГ. Також була встановлена залежність ефекту ПГ на маткову скоротливість від естрогену та прогестерону. Характер змін параметрів скорочень міометрія на тлі пептидоглікану гормонозалежний і відрізняється у тварин з гіперестрогеновим та підвищеним прогестероновим фоном у інтактних невагітних та вагітних тварин.

Експериментально доведено, що у невагітних щурів на відміну від вагітних ЦОГ-2 не задіяна в механізм модуляції пептидогліканом скоротливості міометрія, тому німесулід не пригнічує посилені пептидогліканом спонтанні скорочення. Пептидоглікан в умовах інактивованого кашлюковим токсином  $G_i/0$ -білка не стимулює ні спонтанні, ні простагландиніндуковані скорочення міометрія невагітних щурів.

Також вперше було показано, що для патогенетичного блокування стимуляції ПГ маткової скоротливості під час вагітності можна розглядати не тільки блокатори ЦОГ-2, але й блокатори потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу. В ході роботи вперше проведена візуалізація ПГ-індукованого підвищення внутрішньоклітинного рівня  $Ca^{2+}$  ГМК матки щура.

За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових праць, з яких — 5 статей у фахових наукових журналах та 6 тез доповідей на конференціях і з'їздах.

Таким чином, положення, що виносяться на захист, володіють новизною, достовірністю і в повній мірі представлені в наукових публікаціях.

### **Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.**

Дані, отримані в ході роботи, мають як фундаментальну цінність так і практичну.

Одержані в ході роботи експериментальні дані свідчать про індуковане ПГ порушення характеру скоротливості міометрія як одну з можливих причин безпліддя та інших функціональних розладів репродуктивної системи при інфікуванні золотистим стафілококом.

Після підтвердження на рівні клінічних досліджень вони можуть стати підставою для обстеження носіїв золотистого стафілококу на предмет порушення маткової скоротливості як причини безпліддя. Також стати обов'язковим бактеріологічним лабораторним дослідженням для жінок, які планують вагітність, а також у жінок з безпліддям, якщо інші причини були виключені. Запропонований механізм дії ПГ на скоротливість міометрія доповнює наявні відомості, а значить може розширити можливості контролю та корекції індукованих ПГ золотистого стафілококу аномалій маткової скоротливості.

Крім того, в ході роботи були одержані дані, що свідчать про прямий вплив ПГ золотистого стафілококу на міометрій вагітних і невагітних тварин та здатність модулювати амплітудно-кінетичні показники маткових скорочень. Запропонований автором механізм дії ПГ на скоротливість міометрія доповнює наявні відомості та може

розширити можливості для контролю та корекції індукованих ПГ золотистого стафілококу аномалій маткової скоротливості.

Отримані відомості можуть бути впроваджені в навчальний процес освітніх закладів біологічного, медичного, педагогічного профілю.

**Оцінка змісту дисертації, її завершеності, ідентичності змісту автореферату й основних положень дисертації.**

Дисертаційна робота Л.С. Насіб'ян оформлена відповідно до «Основних вимог до дисертації та авторефератів дисертації» ДАК України. Рукопис побудований за класичною схемою і складається з чотирьох розділів (огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів, узагальнення та висновків.). Основний текст роботи викладено на 112 сторінках та ілюстровано 37 рисунками, та 4 таблицями. Загальний обсяг становить 138 сторінок. Список цитованих джерел включає 135 найменувань.

**У вступній частині дисертації** надано обґрунтування актуальності дисертації; зв'язок роботи з науковими темами відділу; формулювання мети та завдань дослідження; визначення об'єкту, предмету і перелік використаних методів дослідження зі стислою конкретизацією необхідності їх застосування; наукова новизна отриманих результатів та їх практичне значення; особистий внесок здобувача; перелік наукових форумів, де були апробовані основні положення роботи; перелік публікацій за матеріалами дисертації. Автор поряд з описом сучасного стану і актуальності вирішуваних питань чітко окреслює мету та завдання своєї роботи.



Огляд літератури дисертації є інформативним, повним і цікаво викладеним.

При обґрунтуванні вибору теми дослідження автор аналізує сучасний стан проблеми, безпосередньо вказує на те, що персистенція ПГ золотистого стафілококу впливає на розвиток гнійно-септичних ускладнень під час вагітності (хоріоамніоніт, аномалії скоротливості матки та передчасні пологи). Крім того, нічого невідомо про дію ПГ на жіночі репродуктивні органи поза вагітністю. Враховуючи відомості про розвиток загальних та аутоімунних процесів, що виникають на тлі тривалої безсимптомної персистенції пептидоглікану золотистого стафілококу та інших бактерій, та здатністю ПГ викликати стимуляцію маткових скорочень у вагітних дослідних тварин, автор припустив, що ПГ золотистого стафілококу може бути етіологічним фактором дисфункціональних сигналів репродуктивної системи у жінок через порушення маткової скоротливості, тим самим позначив межу дослідження.

В розділі 2 «Матеріали і методи дослідження» ретельно описані методики із характеристикою досліджуваних показників. Комплекс методів, за допомогою яких вирішувались поставлені завдання, був спрямований на з'ясування механізмів дії пептидоглікану золотистого стафілококу на скоротливу активність міометрія щурів. Скорочувальну активність міометрія досліджували методом тензометрії в ізометричному режимі. Запис скорочувальної активності здійснювали через аналогово-цифровий перетворювач. Ізолювання гладеньком'язових клітин міометрія вагітних і невагітних щурів проводили ферментативним методом двоциклової обробки тканини. Для візуалізації змін  $\text{Ca}^{2+}$  на субклітинному рівні



використовували конфокальний комплекс LSM 5 PASCAL на основі інвертованого мікроскопа Axiovert 200M (Zeiss, Методи, Німеччина.) Для створення моделі «псевдовагітності» після попередньої обробки щурів згідно з протоколом естрогенізації щоденно вводили підшкірно медроксипрогестерон в дозі 0,2 мг/тварину. (Пфайзер, Бельгія). Для ідентифікації участі G-білків в ефектах ПГ використовували кашлюковий та холерний токсини. Методи, які здобувач використовував для досягнення мети дисертації, являються сучасними, обґрунтованими та адекватними.

**В розділі 3** власних досліджень здобувач вперше представила вплив пептидоглікану на скоротливість міометрія вагітних та невагітних щурів. Оцінка амплітудно-кінетичних параметрів скорочень міометрія вагітних та невагітних щурів показала, що пептидоглікан статистично і достовірно збільшував амплітуду та тривалість, але зменшував частоту контанних скорочень міометрія в обох групах щурів. В групі вагітних щурів більш вираженим було збільшення амплітуди, в той час як в групі невагітних – тривалості спонтанних скорочень. Було показано залежність ефекту пептидоглікану на скоротливу активність міометрія щурів від естрогену та прогестерону. Доведено, що за умов гіперестрогенії пептидоглікан незначно зменшував частоту спонтанних скорочень міометрія, тобто естроген пригнічував ефект ПГ на скоротливість міометрія, в той час як прогестерон зумовлював стимулюючий ефект ПГ. Досліди впливу пептидоглікану на внутрішньоклітинний вміст  $\text{Ca}^{2+}$  показали, що збільшення внутрішньоклітинного вмісту  $\text{Ca}^{+}$  в групах вагітних та невагітних тварин відбувається внаслідок

посилення його трансмембранного надходження та вивільнення із внутрішньоклітинних кальцієвих депо.

В серіях експериментів за умов підвищеного вмісту цАМФ було показано, що ПГ не впливав ні на спонтанні, ні на простагландин-викликані скорочення. В розділі, де показана участь Gi/0-білку в реалізації ефекту ПГ, було встановлено, що аплікація ПГ не змінила характер ні спонтанних, ні простагландинових скорочень.

В розділі 4 автор проводить аналіз і обговорення результатів дослідження, що дозволило зробити аргументовані висновки, які повністю відповідають меті та завданням дисертаційної роботи. Здобувач аналізує власні результати, порівнює їх з даними літератури, обґрунтовує їх. Дисертація викладена у відповідності з логікою наукової роботи. Мова і стиль викладення матеріалів дисертації відповідають вимогам, що пред'являються до дисертації. Робота завершується 8 висновками, які повністю відображають результати проведених досліджень.

Питання та зауваження, що виникли при ознайомленні з дисертацією.

Принципових зауважень до змісту й оформлення дисертації, які могли б вплинути на загальну позитивну оцінку роботи, немає. Однак маються де-які зауваження.

### **Зауваження**

1 Було б бажано включити в реферат не тільки графічні зображення, а й табличний матеріал, який би відображав усі параметри скоротливої здатності міометрія.



2 В роботі зустрічаються окремі стилістичні помилки, проте зазначені зауваження не носять принципового характеру і не стосуються суті проведених досліджень, які не зменшують позитивної оцінки даної роботи.

При розгляді змісту дисертації виникли наступні питання:

**Питання:**

1 Чим можливо пояснити стимулюючий ефект пептидоглікану на параметри спонтанних скорочень матки при тривалому введенні прогестерону, якщо відомо що прогестерон знижує скоротливу здатність гладкої мускулатури матки?

2 Дія пептидоглікану на скоротливу здатність матки виявлялась тільки у «псевдовагітних» щурів? Контрольна група щурів з фізіологічною вагітністю не використовувалась в експериментах? Або це не було метою даної роботи?

3 Чи проводилися дослідження гормонального статусу щурів до початку експериментів, а також в групах естрогенізованих і псевдовагітних щурів?

Поставлені запитання не впливають на загальну позитивну оцінку роботи та не зменшують її наукової цінності.

**Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.**

Дисертаційна робота Насібян Ліліт Седраківни «Механізм дії пептидоглікану золотистого стафілококу на скоротливу активність міометрія щурів», що подана на здобуття наукового ступення кандидата біологічних наук, за своєю актуальністю і значимістю

отриманих результатів, також виконана на високому науковому рівні і цілком відповідає всім вимогам, встановленим ДАК України, які висуваються до кандидатських дисертацій. Дисертантом чітко сформульована мета і відповідно до мети поставлені завдання дослідження. Вирішення поставлених завдань відображено у розділах експериментального дослідження. Достовірність даних і наукових висновків, зроблених на їх основі, є високою і визначається кількісно і якісно поданим експериментальним матеріалом.

Основні положення й результати дисертації були представлені та обговорені на конференціях, конгресах та профільних наукових форумах: Всеукраїнській науковій конференції студентів та молодих науковців, Київ 2010; Міжнародній науково-практичній конференції «Високі технології, фундаментальні та прикладні дослідження в біології та медицині».

Санкт-Петербург, Росія 2010; Всеукраїнській науково-практичній конференції за участю молодих вчених та студентів з міжнародною участю, «Сучасні аспекти медицини та фармації – 2015р», Запоріжжя, 2015 р. на конференції «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції.» Харків, Україна 2016; у VII конгресі українського товариства нейронаук, 2017 Київ, у VII з'їзді Українського біофізичного товариства, 2018 Київ-Луцьк.

Зважаючи на зв'язок з науковими темами і широке висвітлення результатів у науковій літературі, обговорення на численних міжнародних форумах, а також перспективність напрямку даних досліджень, вважаю, що дисертація відповідає п.11 «Порядку присудження наукових ступенів» Постанови Кабінету Міністрів



України від 24 липня 2013 року №567 (зі змінами, внесеними в Постановах КМ №656 від 19.08.2015, №1159 від 30.12.2015 та №567 від 27.07.2016), щодо кандидатських дисертацій, а її автор Насібян Ліліт Седраківна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.13 - фізіологія людини і тварин.

**Офіційний опонент:**

доктор медичних наук, професор  
завідувач жіночою консультацією  
ТОВ «Клініка репродуктивної медицини  
імені академіка В.І. Грищенка»

Е.Л. Торянік

*Підпис Торянік Е.Л. засвідчую:*  
начальник відділу кадрів ТОВ  
«Клініка репродуктивної медицини  
імені академіка В.І. Грищенка»



*М.В. Кафенко*