

## **ВІДГУК**

### **офіційного опонента**

на дисертаційну роботу Прокопюка Володимира Юрійовича, «Біотехнологія отримання та низькотемпературного зберігання похідних плаценти для лікування гінекологічної патології» подану на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

#### **1. Актуальність теми дисертаційного дослідження.**

Регенеративна медицина є сучасним та перспективним напрямком розвитку медичної науки, який може вирішити ряд проблем, недосяжних для фармакотерапії. Ключовими питаннями регенеративної медицини є розроблення технології отримання та зберігання клітинних та тканинних препаратів, вивчення механізму їх дії, безпечності, показань та протипоказань до застосування. Певні переваги має плацентарний матеріал: велика кількість, низька імуногенність, висока активність клітин, відсутність етичних проблем при отриманні.

Природними особливостями плаценти є тропність до жіночої статеві системи, можливість змінювати фізіологічні процеси та перебіг хвороб в організмі жінки під час та після вагітності. Саме це є підґрунтям до застосування похідних плаценти для впливу на жіночу статеву систему.

Невирішеними є питання розроблення біотехнологій отримання та зберігання різних похідних плаценти. На сьогоднішній день практично безальтернативними методами зберігання препаратів для регенеративної медицини є застосування низьких температур. Тому дисертаційна робота Прокопюка Володимира Юрійовича, є актуальною та своєчасною.

#### **2. Обґрунтованість та достовірність наукових положень і висновків, сформульованих у дисертації.**

В дисертаційному дослідженні для отримання та характеристики похідних плаценти застосовували методи культивування клітин, тканин, світлову,

конфокальну лазерну скануючу мікроскопію, проточну цитометрію, біохімічні методи. Для оцінки впливу факторів кріоконсервування застосовували програмне заморожування, кріомікроскопію. Для оцінки впливу похідних плаценти на жіночу репродуктивну систему застосовували моделювання патологічних станів на лабораторних тваринах, гістологічні, морфометричні, біохімічні методи. Використовували комп'ютерну обробку зображень, даних конфокальної мікроскопії, проточної цитометрії, статистичну обробку даних. Всі перераховані методи є сучасними, актуальними, дозволяють об'єктивно оцінити результати експериментів та широко застосовуються для подібних досліджень.

Положення та висновки дисертації, логічно витікають з отриманих даних та не протиречать сучасним науковим поглядам, роботам інших фахівців та колективів, що працюють в галузі регенеративної медицини. Всі розділи роботи опубліковані в рецензованих журналах та представлені у якості апробації на достатній кількості семінарів та наукових конференцій.

### **3. Відсутність порушення принципів академічної доброчесності.**

При аналізі роботи порушень принципів академічної доброчесності виявлено не було. Якість роботи також підтверджено наявністю публікацій в рецензованих наукових виданнях 1-3 кварталів з високим імпаکت фактором з відкритим доступом, наявністю патентів України та апробацією роботи на наукових конференціях.

### **4. Оцінка змісту дисертаційної роботи та її завершеності.**

Дисертація є завершеною науковою працею. Робота викладена на 325 сторінках комп'ютерного тексту та складається з десяти розділів: вступ, анотацію, огляд літератури, розділ «Матеріали і методи дослідження», три розділи результатів власних досліджень, узагальнення, висновки, список посилань, ілюстрована 32 таблицями і 99 рисунками.

В огляді літератури розглядаються сучасні уявлення про плаценту, екстраплацентарні трофобластичні структури та штучні похідні плаценти, їх ембріогенез, структуру, функцію, імунологічні та ендокринологічні особливості, притаманні вагітності, можливості та особливості їх кріоконсервування,

застосування в регенеративній медицині, зокрема для лікування патології жіночої репродуктивної системи.

У розділі «Матеріали та методи дослідження» описано дизайн дослідження, методи отримання похідних плаценти, їх характеристики, визначення кріочутливості, особливостей кріоушкоджень. Особлива увага приділена культуральним методикам, та методам моделювання патологічних станів на культурах клітин та лабораторних тваринах. Автором обрано стандартні, відтворювані методи, прийняті більшістю науковців для подібних досліджень.

Власні дослідження описано в трьох розділах роботи, де кожен наступний логічно витікає з попереднього.

Перший підрозділ присвячений дослідженню морфо-функціонального стану плацентарних біооб'єктів різного ступеня організації (клітин та експлантів плаценти, сфероїдів, а також клітин плаценти, інкапсульованих в альгінатні мікросфери) до і після субнормотермічного, гіпотермічного зберігання, та кріоконсервування (з використанням різних режимів та кріозахисних середовищ). В розділі отримані необхідні дані для розробки біотехнології отримання, зберігання та оцінки різних похідних плаценти, обрані найперспективніші з них.

Другий розділ власних досліджень присвячений дослідженню впливу нативних та кріоконсервованих похідних плаценти в системі *in vitro* на культури клітин. Доведено, що середовища, кондиційовані нативними та кріоконсервованими клітинами та експлантами плаценти, підвищують метаболічну активність нейроклітин, органотипових культур матки, пригнічують її в культурах яєчниках, спленоцитів та не впливають на метаболічну активність фібробластів. В кінці розділу на основі отриманих даних порівнюються різні похідні плаценти та описується їх перспективність.

У третьому підрозділі в системі *in vivo* представлені результати дослідження впливу кріоконсервованих експлантатів плаценти на статеву систему, фертильність, астральний цикл, статеву активність та репродуктивні показники здорових самиць та після моделювання інфекційного процесу, антифосфоліпідного синдрому,

синдрому полікістозних яєчників, перекруту яєчників, передчасного виснаження яєчників, операційної травми матки. На основі отриманих даних описано перспективи застосування похідних плаценти.

### **5. Наукова новизна результатів, отриманих в дисертаційній роботі.**

Дисертантом вперше порівняні морфофункціональні властивості різних похідних плаценти: встановлено, що експланти, клітини плаценти в суспензії та в альгінатних мікросферах є більш стійкими при культивуванні, та низькотемпературному зберіганні, ніж сфероїди, отримані з клітин плаценти.

Виявлено, що за умов субнормотермії експланти, клітини плаценти в суспензії та в альгінатних мікросферах зберігають структуру, життєздатність та метаболічні характеристики протягом двох діб, а сфероїди – до однієї доби, а за умов гіпотермічного зберігання всі похідні плаценти залишаються збереженими протягом доби.

Вперше проаналізовані особливості кріоушкодження похідних плаценти в залежності від їх структури: для експлантів характерні розриви мезенхіми та десквамація трофобласту внаслідок росту кристалів льоду, для сфероїдів – втрата міжклітинних контактів при взаємодією з кріопротектором та при льодоутворенні. На прикладі альгінатних носіїв та диметилсульфоксиду виявлена можливість взаємодії носія з кріопротектором. Проаналізована ефективність та перспективність застосування різних кріозахисних середовищ для біотехнологій зберігання похідних плаценти.

Вперше в системі *in vitro* продемонстровано, що середовища, кондиційовані нативними та кріоконсервованими клітинами та експлантами плаценти підвищують метаболічну активність нейроклітин, органотипових культур матки, пригнічують її в культурах яєчниках, спленоцитів та не впливають на метаболічну активність фібробластів.

Вперше в експерименті на лабораторних тваринах комплексно проаналізовано вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на жіночу статеву систему та перебіг гінекологічної патології. Продемонстровано, що імплантація кріоконсервованих

експлантів плаценти покращує перебіг експериментальних антифосфоліпідного синдрому, синдрому полікістозних яєчників та передчасного виснаження яєчників після хіміотерапії, але при несановному інфекційному процесі знижує фертильність через підвищене спайкоутворення та активацію запалення.

#### **6. Практичне значення результатів дисертаційної роботи**

Автором запропоновано біотехнологічні підходи до отримання, кріоконсервування, субнормотермічного та гіпотермічного зберігання похідних плаценти в тому числі застосуванням менш токсичних препаратів згідно GMP. Запропоновано оцінки стану плацентарного матеріалу на етапах біотехнологічного процесу. Обрані підходи можуть також бути застосовані для інших об'єктів регенеративної медицини. Виявлено напрямки застосування похідних плаценти для лікування патології жіночої репродуктивної патології.

#### **7. Повнота викладу наукових результатів в опублікованих працях**

Основні положення дисертаційної роботи викладені у 65 наукових публікаціях, серед них монографій – 3 (у співавторстві), 12 статей у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз Scopus та Web of science, 10 статей у фахових виданнях України, 3 статті у інших періодичних виданнях, фахових за спеціальністю «медицина», 5 патентів України на корисну модель, 32 публікацій матеріалів конференцій і повністю відображають основний зміст рецензованої роботи. Реферат дисертації відповідає тексту роботи.

#### **8. Принципових зауважень щодо змісту та оформлення дисертації не має.**

В процесі рецензування виникли наступні запитання:

1. При оцінці впливу нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на патологічні стани статевої системи самиць, чи порівнювали ви з референтними препаратами, які використовуються в практичній гінекології для підтвердження їх більшої ефективності у порівнянні?

2. Який вік тварин (самиць) ви використовували для експерименту?

Якому віку жіночої статі вони відповідають?

3. При аналізі результатів післядії похідних плаценти на різних моделях чи були виявлені загальні та окремі закономірності особливостей в механізмах?
4. Чи доречно говорити в експерименті про терапевтичне лікування, можливо треба писати що це є корекція? Чи доречно говорити що у тварин є гінекологічна патологія? Можливо краще писати порушення органів репродуктивної системи самиць?
5. На основі експериментального обґрунтування результатів чи планується розробка методичних рекомендацій для екстраполяції в практичну медицину?

**9. Висновок щодо відповідності докторської дисертації встановленим вимогам.**

Таким чином, дисертаційна робота Прокопюка Володимира Юрійовича «Біотехнологія отримання та низькотемпературного зберігання похідних плаценти для лікування гінекологічної патології» за рівнем виконаних досліджень, достовірністю та ступеню обґрунтованості наукових положень та висновків, новизною та практичним значенням, повнотою викладення у наукових публікаціях, відповідає вимогам, що ставляться до докторських дисертацій, пунктів 7 та 9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеню доктора наук», затвердженого постановою КМУ №1197 від 17.11.21 та автор, Прокопюк Володимир Юрійович заслуговує на присудження наукового ступеню доктор біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Опонент,

д.б.н., проф., завідувача лабораторії

фармакології ДУ «Інститут проблем

ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського

НАМН України



Наталія МАЛОВА