

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

Актуальність теми дослідження

Останніми десятиріччями біотехнологія продемонструвала величезні досягнення у створенні нових продуктів і матеріалів, генноінженерних конструкцій, модифікованих тваринних і рослинних організмів. Чимало з них знайшли застосування у медицині, що зберегло життя і здоров'я мільйонам людей в усьому світі. Стрімкими темпами розвивається регенеративна медицина, знов таки, завдяки біотехнологіям. Водночас виникла проблема збереження біологічного матеріалу для діагностики і лікування, зокрема вакцин, антитіл, тканин і органів живих організмів з метою їх трансплантації, тощо.

На сьогоднішній день досягнуто великих успіхів в подоланні жіночих репродуктивних проблем. Зокрема, неможливо уявити сучасні допоміжні репродуктивні технології (екстракорпоральне запліднення) без генноінженерних гонадотропних гормонів гіпофіза, або лікування раку простати без синтетичних аналогів гіпоталамічного релізінг-фактора лютеїнізуючого гормону. Але сучасні методи лікування не завжди є ефективними, що потребує пошуку новітніх методів з іншими механізмами дії. Це особливо важливо для жінок, якість життя яких значною мірою залежить від функціонування статевої системи. Крім того в сучасному суспільстві України є запит на подолання демографічної кризи, і збереження та відновлення репродуктивної функції при гінекологічних хворобах є одним із пріоритетів Всесвітньої організації охорони здоров'я і української держави у

сфері медицини. Збереження репродуктивного здоров'я має стратегічне значення для сталого розвитку суспільства.

Методи регенеративної медицини є перспективними для вирішення задач відновлення нормального функціонування жіночої статеві системи. Плацента є перспективним джерелом біологічного матеріалу для лікування гінекологічної патології, оскільки вона в першу чергу впливає на жіночу статеву систему, є доведеним джерелом стовбурових клітин, гормонів та інших біологічно активних речовин, а донатія плацентарного матеріалу є безпечною для донорів. І хоча питаннями біотехнології отримання, зберігання плацентарного біоматеріалу, вибір їх форм застосування, показань, протипоказань, ефективності займаються чимало дослідників, проблема ця потребує суттєвого удосконалення. Кріобіологія і кріомедицина є тією галуззю науки, яка обіцяє подолати перешкоди на цьому шляху. Саме тому вибір теми докторської дисертації В.Ю. Прокопюка слід привітати і саму тему визнати вкрай актуальною.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і
рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність і
новизна.**

Наукові положення дисертації обґрунтовані численними експериментами, які виконані із застосуванням методик, що відповідають світовим стандартам. Здобувачем було застосовано культуральні методи, світлову, конфокальну лазерну скануючу мікроскопію, протокову цитометрію, біохімічні методи, кріомікроскопію з термометрією, моделювання патологічних станів в системах *in vitro* та *in vivo*, гістологічні, морфометричні методи. Використано комп'ютерну обробку зображень, даних конфокальної мікроскопії, проточної цитометрії. Експериментальні методи є сучасними, достовірними, повністю відповідають меті і задачам дослідженн. Виконао величезний обсяг експериментів на достатній кількості експериментальних груп. Надійність висновків і рекомендацій не викликає сумнівів, вона підтверджена адекватним статистичним аналізом отриманих даних.

Новизна результатів досліджень забезпечена їхнім всебічним комплексним характером. Отримано оригінальні дані щодо біотехнології приготування, кріоконсервації та гіпотермічного зберігання експлантів плаценти, виділених з неї клітин у суспензіях, сфероїдах та інкапсульованих в альгінатних сферах, їх всебічної характеристики а також оцінки ефективності застосування при різних формах експериментальної гінекологічної патології

Відсутність порушення принципів академічної доброчесності.

В роботі представлені власні ідеї автора, підтверджені власними експериментами і наявністю публікацій в колективних монографіях, вітчизняних і закордонних рецензованих наукових журналах з високим наукометричним рейтингом (індексованих у міжнародних наукометричних базах даних Scopus, Web of Science, SCImago Journal), виступами на міжнародних конференціях, наявністю патентів України. Ознак запозичень чи інших порушень при знайомстві з роботою не виявлено.

Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому та ідентичності змісту реферату й основних положень дисертації.

Робота викладена на 325 сторінках тексту, побудована за класичною схемою, яка відповідає сучасним вимогам до дисертаційних робіт. В роботі присутні анотація, зміст, перелік умовних скорочень, вступ, три розділи власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, висновки, перелік використаних джерел, додаток з переліком публікацій за темою дисертації.

Анотація (реферат) роботи написана українською та англійською мовами, стисло описує зміст роботи, є ідентичною основним положенням дисертації. Перелік публікацій за темою дисертації, який слідує за анотацією, включає 65 посилань, оформлений згідно сучасних вимог. У публікаціях зазначається особистий внесок автора.

У вступі обґрунтовано актуальність теми роботи, поставлено ціль, задачі, об'єкт та предмет дослідження, наведені проекти, у рамках яких виконувалася робота, наведені основні методи дослідження, наукова новизна,

практичне значення, особистий внесок дисертанта, дані про апробацію, окреслено об'єм та структуру дисертації.

Розділ «Огляд літератури» складається з чотирьох підрозділів. Автором проведено критичний аналіз традиційних та сучасних наукових поглядів щодо структури та функції плаценти, біотехнологій отримання та застосування похідних плаценти для лікування гінекологічної патології, що дозволило обрати ціль та задачі дослідження, обґрунтувати його актуальність. Окреслено історичні аспекти проблеми, зокрема розвиток даного напрямку в Україні, до чого дисертант був безпосередньо дотичний, працюючи із засновником досліджень застосування кріопродуктів плаценти в гінекології академіком В.І. Грищенком та продовжуючи під час керівництва Інститутом кріобіології і кріомедицини НАН України академіком А.М. Гольцевим і професором О.Ю. Петренком.

Автор наводить інформацію, необхідну для розуміння сучасного стану проблеми, висвітлює невирішені питання та окреслює перспективні напрямки для розробки нових біотехнологій на сучасному рівні. Першочергова увага приділяється опису плаценти як джерелу біоматеріалу для застосування в регенеративній медицині, зокрема для лікування гінекологічної патології.

У розділі «Матеріали та методи» описано дизайн дослідження, обґрунтовано застосування обраних методів та їх послідовності. Обрано об'єкти дослідження: клітини в суспензії як класичний об'єкт регенеративної медицини, експланти – об'єкт, найбільш наближений до природних структур, та два тканинноінженерних об'єкта – сфероїди, об'єднанні міжклітинними зв'язками та клітини в альгінатних капсулах. На основі сучасних даних обрано напрямки пошуку біотехнологічних підходів до отримання та гіпотермічного зберігання похідних плаценти та методи тестування отриманих зразків на клітинному та організменому рівнях. Такий вибір об'єктів та підходів дозволяє розробити та всебічно оцінити ефективність розроблених біотехнологій.

В дизайні дослідження повідомляється про поділ роботи на три етапи: розробка біотехнології отримання та зберігання похідних плаценти,

дослідження похідних плаценти в системі *in vitro* на культурах клітин і *in vivo* в експериментальних моделях патологічних станів на лабораторних тваринах. Тобто в першому, найбільшому та основному розділі, розробляються біотехнології отримання та зберігання об'єктів для регенеративної медицини, а в наступних двох проводиться перевірка їх властивостей та ефективності.

Методи дослідження описані чітко, є сучасними, відтворюваними, більшість з них широко застосовувалися різними дослідниками та мають відповідні літературні посилання на журнали з високим імпакт-фактором. Кріомікроскопічне дослідження виконано на унікальному обладнанні, виготовленому в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Для інших досліджень застосовувалося сертифіковане серійне обладнання, мається опис виробників приборів, реагентів, програмного забезпечення. Відображено біоетичні аспекти і статистичні методи оброблення отриманих даних.

Згідно розробленому дизайну дослідження, їх результати представлені у трьох розділах, кожен з яких ґрунтується на результатах попереднього.

Розділ «Дослідження впливу факторів кріоконсервування та гіпотермічного зберігання на похідні плаценти» складається з чотирьох підрозділів, у яких детально описано різні методи зберігання, вплив факторів кріоконсервування та гіпотермічного зберігання на чотири різні типи похідних плаценти: експланти плаценти, клітини в суспензії, в сфероїдах, в альгінатних сферах. Апробовано декілька способів виділення клітин плаценти, вони характеризовані як мезенхімальні стромальні клітини за загальноприйнятими ознаками, вивчені їх культуральні характеристики. Досліджено вплив різних температурних режимів та різних компонентів кріозахисних середовищ на клітини, можливості довгострокового зберігання при різних температурах та коливаннях температур.

За допомогою кріомікроскопічного дослідження, світової та конфокальної мікроскопії виявлені особливості ушкодження різних об'єктів за умов низькотемпературного зберігання. Продемонстровано, як формуються

кристали льоду в різних структурах, за різних умов, як вони взаємодіють з клітинами, міжклітинною речовиною, штучними компонентами, які саме частини біоінженерних об'єктів вони пошкоджують. Несподіваним і цікавим з практичної точки зору є положення про те, що температура 20°C є більш сприятливою для збереження, ніж глибока гіпотермія. Отримані дані можуть бути корисними для подальшої розробки інших біотехнологій.

На основі отриманих даних запропоновані біотехнології отримання, зберігання, оцінювання похідних плаценти. Визначено, що експланти та клітини плаценти є найбільш перспективними для застосування.

У розділі «Дослідження властивостей нативних та кріоконсервованих трофобластичних структур в ізольованих системах» представлено вплив нативних та кріоконсервованих похідних плаценти в системі *in vitro*. Об'єкти дослідження було обрано згідно рівнів регуляції жіночої статевої функції: нейроклітини, органотипові культури матки, яєчників. Додатково застосовували фібробласти, які формують строму кожного органу, та спленоцити, які є імунокомпетентними клітинами.

Отримані ефекти відповідають біологічним властивостям плаценти та стовбурових клітин, що входять до її складу. Так, експланти та клітини плаценти стимулюють метаболічну активність органотипових культур матки, культури нейроклітин та пригнічують метаболічну активність спленоцитів та органотипових культур яєчників. Подібні явища спостерігаються при вагітності: відсутність циклічних змін в яєчниках, гіпертрофія матки та перебудова імунної відповіді. Відсутність впливу на фібробласти свідчить про те, що ефекти відбуваються за рахунок специфічних функціональних елементів органотипових культур, а не за рахунок сполучнотканинного компоненту.

Продемонстровано однаковий біологічний вплив кріоконсервованих та нативних похідних плаценти, що підтверджує ефективність запропонованих біотехнологій. В кінці розділу порівняно обрані біотехнології з урахуванням даних, отриманих у двох розділах. Для подальшого дослідження обрано

кріоконсервовані експланти плаценти, які, на думку автора, є найбільш перспективними для клінічного застосування на сучасному етапі розвитку науки та інфраструктури медичних та біотехнологічних установ.

У розділі «Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на жіночу репродуктивну систему в нормі та при патології» представлено скринінгове доклінічне дослідження ефективності, показань та протипоказань застосування кріоконсервованих експлантів плаценти при соціально значущій, найбільш поширеній гінекологічній патології.

Ідею застосовувати саме похідні плаценти для лікування гінекологічної патології засновано на відомому факті, що під час та після вагітності перебіг ряду захворювань змінюється у кращому напрямку. Ці ефекти пояснюються специфічною функцією плаценти, стимулюючих факторів стовбурових клітин або тканин плоду. Так, під час та після вагітності практично не буває запальних захворювань, яєчників та матки, ендометріозу, прогресування кіст яєчників, полегшується перебіг цукрового діабету, гіпотеріозу, аутоімунних хвороб. Втім прогресують запальні захворювання нирок, сечових шляхів, гіпертонічні стани, деякі захворювання ЖКТ, що має слугувати обмеженнями для застосування кріоконсервованих похідних плаценти.

Здобувачем досліджено вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на організм здорових тварин. Продемонстровано, що їх дія аналогічна ефекту, який оказує плацента при вагітності: гіпертрофія матки, яєчників, затримка овуляції, затримка настання вагітності.

У якості експериментальних патологічних станів для скринінгового дослідження обрано різні за патогенезом процеси (інфекційний процес, передчасне виснаження яєчників, перекрут яєчників, синдром полікістозних яєчників, антифосфоліпідний синдром, операційна травма), що охоплює більшу частину звернень за гінекологічною допомогою. Виявлено, що застосування похідних плаценти може бути ефективним при ендокринній, аутоімунній патології, гіпофункції або дисфункції яєчників. Протипоказанням до їх застосування може бути несанований інфекційний процес.

Текст дисертації супроводжується численними таблицями та ілюстраціями (графіками, мікрофотографіями тощо), які документально підтверджують результати експериментів.

Стисла суть роботи, аналіз отриманих даних та відповідність сучасним науковим поглядам інших авторів відображено в розділі «Аналіз та узагальнення результатів».

Отримані висновки і рекомендації цілком обґрунтовані, відповідають отриманим даним та поставленим задачам.

Завершує дисертаційну роботу список з 327 використаних джерел та додаток, який містить список публікацій здобувача за темою дисертації та відомості про апробацію дисертації – відповідно до актуальних вимог з оформлення дисертації. В роботі мається 32 таблиці і 99 рисунків.

Дисертаційна робота є цілісним завершеним дослідженням, яке комплексно охоплює питання розробки біотехнологій отримання та гіпотермічного зберігання різних похідних плаценти, які можуть бути застосовані для лікування гінекологічної патології, та включає тестування отриманих біопрепаратів в системах *in vitro* на культурах клітин та *in vivo* на моделях патологічних станів.

Наукова новизна одержаних результатів.

У дисертаційній роботі було проведено теоретичне обґрунтування та вирішення задачі розроблення біотехнології гіпотермічного отримання та зберігання похідних плаценти для лікування гінекологічної патології.

Уперше в порівняльному аспекті виявлені особливості кріоушкодження різних похідних плаценти в залежності від їх структури: клітин, сфероїдів, експлантів, альгінатних сфер, що містять клітини плаценти. Розуміння цих особливостей дає змогу розробляти біотехнології зберігання багатоклітинних конструкцій та створювати нові тканинноінженерні конструкції з низькою кріочутливістю. Проаналізовано вплив окремих компонентів захисних середовищ на збереженість клітин плаценти. Запропоновано методи зберігання похідних плаценти з застосуванням стандартів GMP, препаратів,

дозволених для використання та устаткування, що є в більшості лікарень. Запропоновано біотехнології зберігання та транспортування похідних плаценти за гіпотермічних та субнормотермічних умов. Вперше проведено моделювання умов довготривалого збереження та транспортування клітин плаценти, що дозволяє прогнозувати можливі втрати біоматеріалу при змінах температури.

Новизну дисертації характеризує також дослідження властивостей похідних плаценти в умовах парного культивування в системі *in vitro*. Проведено порівняння впливу нативних та кріоконсервованих експлантів та клітин плаценти на культури фібробластів, спленоцитів, нервових клітин, культур яєчників та матки.

Уперше проаналізовано вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на жіночу статеву систему лабораторних тварин в експерименті при найбільш розповсюджених формах патології жіночої статевої системи на експериментальних тваринних моделях. На основі отриманих даних обґрунтовані рекомендації щодо показання та протипоказання до застосування похідних плаценти при патології жіночої репродуктивної системи.

Практичне значення одержаних результатів.

У роботі розроблено біотехнології кріоконсервування та гіпотермічного зберігання тканин та тканинноінженерних конструкцій, які можуть бути застосовані не тільки для похідних плаценти, а й для об'єктів з інших тканин, клітин. Рекомендовано методи швидкої оцінки вихідного стану та збереженості після кріоконсервування та гіпотермічного зберігання експлантів, сфероїдів з плаценти, які можуть бути застосовані для інших тканин, багатоклітинних комплексів. Ці методи можуть бути застосовані в практиці низькотемпературних банків клітин, тканин та органів. Запропоновані методи кріоконсервування та короточасного гіпотермічного зберігання біооб'єктів базуються на основі дозволених до застосування в клінічній практиці речовин та обладнання, що є у більшості лікарень.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях.

Результати дисертаційного дослідження повністю опубліковані у 65 працях, з яких 12 статті в журналах, включених у міжнародні наукометричні бази даних (Scopus, Web of Science, SCImago Journal), 10 у наукових фахових виданнях України, 3 глави монографій, 32 тези матеріалів конференцій, симпозіумів, конгресів, 5 патентів України.

Зауваження та запитання щодо змісту дисертації.

Недоліками дисертації вважаю досить велику кількість орфографічних та стилістичних помилок. До прикладу, «...обережно міняли середовище та клітини адгезували» (стор. 193). «Шаром ендометрію був також добре розвинутим» (стор. 232). «...відновлення операційної травми матки» (стор. 254). Чимало пропущених розділових знаків, неправильних відмінків.

Подекуди текст потребує більше пояснень, особливо коли це стосується специфічних галузей або застосування специфічних методів дослідження. У роботі не роз'яснюється, що таке масовий коефіцієнт органів, який фігурує у таблицях.

З опису методів виділення клітин не зовсім зрозуміло, які клітини плаценти, окрім мезенхімальних стовбурових, ідентифіковані у суспензії. Це стосується і нейроцитів головного мозку тварин, бо в гомогенаті присутні і гліальні елементи.

,На стор. 233 написано, що «...відносна чи абсолютна гіперестрогенія призводить до порушення фолікулогенезу, овуляції, естрального циклу та стоншення ендометрію». Насправді атрофія ендометрію зумовлена прогестероновою недостатністю внаслідок зменшення або відсутності постовуляторний жовтих тіл, а також завдяки гіперандрогенії, притаманній синдрому полікістозних яєчників.

При аналізі роботи виникли деякі запитання, а саме:

1. Як Ваша робота пов'язана та чим відрізняється від робіт академіка Валентина Івановича Грищенко по застосуванню препаратів плаценти,

наприклад його роботи по застосуванню екстракту плаценти при лікуванні запальних захворювань яєчників та їх наслідків?

2. Чим пояснюється те, що температура 20°C є більш сприятливою для збереження плацентарного матеріалу, ніж гіпотермічні умови?

3. Що Ви маєте на увазі, розглядаючи нейральні клітини як «елемент регуляції статевої функції», коли вивчали вплив на них кріоконсервованих похідних плаценти (стор. 193)? Адже терміном «нейральні (нейрогенні)» клітини прийнято називати стовбурові нервові клітин, попередники нейронів і астроцитів.

4. Експланти фрагментів плаценти позбавлені лімфоцитів, що продукують PIBF - прогестерон-індуцибельний блокуючий фактор. Як відомо, він пригнічує Th-1 лімфоцити і в такий спосіб попереджує імунний конфлікт між антигенами матері і антигенами батька в геномі плоду і батька, зберігаючи вагітність. Чи потрібні додаткова імуносупресія в разі аллотрансплантації фрагмента плаценти, тобто за генетичної відмінності донора і реципієнта?

5. Як довго зберігається життєздатність трансплантованого матеріалу плаценти в організмові тварин-реципієнтів і чи проводились у цьому напрямку морфологічні дослідження?

6. У щурів з експериментальним полікістозом яєчників спостерігались жовті тіла у великій кількості (стор. 233). Чи йдеться про так звані хибні жовті тіла, які утворюються з лютеїнізованих атретичних фолікулів, що не пройшли фазу овуляції?

7. Чи існують можливості відтворення або збереження фолікулярного апарату яєчників після хіміотерапії за допомогою запропонованих Вами біотехнологічних продуктів?

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» є завершеним науковим дослідженням, яке вирішує важливу наукову і практичну проблему створення біотехнологічних продуктів плаценти, їх кріогенної консервації для застосування у гінекологічній практиці, і за актуальністю, науковим 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, у пунктах 7 та 9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеню доктора наук», затвердженого постановою КМУ №1197 від 17.11.21. Автор дисертації Прокопюк Володимир Юрійович заслуговує на присудження наукового ступеню доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент,

Доктор медичних наук, професор,

член-кореспондент НАН України, академік НАМН України,

Заслужений діяч науки і техніки України,

завідувач відділу ендокринології репродукції
і адаптації ДУ «Інститут ендокринології та обміну
речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

Олександр РЕЗНІКОВ

