

ВІДГУК

**офіційного опонента – доктора біологічних наук,
старшого дослідника, заступника директора з наукової роботи, завідувача
відділу структури і функції білка Інституту біохімії
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України**

Чернишенка Володимира Олександровича

**на дисертацію Прокопюка Володимира Юрійовича «Біотехнологія
отримання та низькотемпературного зберігання похідних плаценти для
лікування гінекологічної патології», представленій в спеціалізовану вчену
раду Д 26.002.28 Національного технічного університету України «Київський
політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.**

Детальний аналіз дисертаційного дослідження Володимира Юрійовича Прокопюка «Біотехнологія отримання та низькотемпературного зберігання похідних плаценти для лікування гінекологічної патології» дозволяє сформулювати наступні узагальнені висновки щодо актуальності, ступеня обґрунтованості основних наукових положень, висновків, рекомендацій, достовірності, наукової новизни, а також загальної оцінки роботи.

Актуальність теми дисертації.

Дисертаційну роботу Володимира Юрійовича Прокопюка присвячено розробці схеми ефективного біотехнологічного процесу отримання та низькотемпературного зберігання препаратів похідних плаценти для лікування гінекологічної патології.

Гінекологічні розлади залишаються серйозною медичною проблемою, і за прогнозами кількість хворих буде зростати внаслідок старіння та депопуляції населення. Прояви жіночих хвороб почастишали більш ніж на 25%. Підвищення ризику гінекологічних захворювань та акушерських ускладнень спонукає до пошуку ефективних методів лікування та профілактики.

На жаль, існуючі методи лікування гінекологічної та акушерської патології не забезпечують 100% ефективності, тому потребують вдосконалення та пошуку нових шляхів подолання проблеми. Пошук шляхів запобігання гінекологічним розладам, розробка способів ефективної реабілітації пацієнтів є актуальним питанням медичної біохімії та біотехнології.

Об'єктом дослідження автором було обрано біотехнологічні підходи до отримання та низькотемпературного зберігання похідних плаценти, які можуть бути використані в медичній практиці.

Екстракти плаценти давно використовували як активатори фізіологічних функцій в організмі людини. Вони мають різноспрямований вплив на перебіг патологічних процесів і застосовуються в схемах комплексного лікування та реабілітації хворих, зокрема, з гінекологічними патологіями. Кріоекстракт плаценти, будучи одним з найбільш простих у зберіганні та використанні кріопрепаратів, має виражені імунокоригуючі та регенеративні властивості, вигідно відрізняючись від препаратів, підданих термічній обробці. При цьому кріоконсервація забезпечує постійний і безпечний для пацієнтів запас цього матеріалу в низькотемпературному банку. Трансплантація кріоконсервованих фрагментів плаценти впливає на органи-мішені, стимулюючи їх функцію і підвищуючи неспецифічну резистентність організму до негативних факторів. На сьогодні проблеми розробки біотехнологій отримання і низькотемпературного зберігання різних похідних плаценти, з'ясування механізмів впливу її кріоконсервованих похідних на статеву систему, перебіг експериментальних гінекологічних захворювань для створення нових методів лікування залишаються невирішеними. При цьому механізм дії кріоконсервованих препаратів плаценти не завжди з'ясовано, отримані на різних об'єктах результати не є стандартизованими. До того ж, хоча проблеми низькотемпературного зберігання клітин є досить вирішеними, за відсутності методів зберігання багатоклітинних структур, тканин та органів до половини донорського матеріалу не може бути трансплантовано.

Таким чином, невирішеними є проблеми розробки біотехнологій отримання і низькотемпературного зберігання різних похідних плаценти, розуміння пошкоджуючої дії факторів та з'ясування механізмів впливу кріоконсервованих похідних плаценти на статеву систему, перебіг експериментальних гінекологічних захворювань для створення нових методів лікування. Актуальність роботи є безсумнівною.

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

Дисертаційну роботу виконано в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України в рамках науково-дослідних робіт «Вивчення механізмів кріостійкості тканин та екстрактів плаценти до дії низьких температур» (ДР №0109U00277), «Проведення наукових досліджень, розробка та втілення інформаційних, організаційних та технічних заходів, необхідних для збереження і використання наукового об'єкта – низькотемпературного банку біологічних об'єктів» (ДР № 0104U006441), «Дослідження геропротекторної та геротерапевтичної дії плацентарних біооб'єктів» (ДР № 0114U00131),

«Генетична модифікація та довгострокове зберігання клітин плаценти для клінічного застосування» (ДР № 0113U002955, Україно-Німецький проєкт), «Нейропротекторний потенціал плацентарних кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин, екстракту, сироватки кордової крові при ураженнях спинного мозку» (Україно-Словацький проєкт).

Достовірність та наукова новизна одержаних результатів.

Загальний аналіз змісту роботи свідчить про системний, цілісний та самостійний характер дослідження, його високий науковий рівень та новизну.

Автором в експерименті вперше проведено комплексне теоретичне обґрунтування, вирішення біотехнологічних проблеми отримання, кріоконсервування, гіпо- та субнормотермічного зберігання похідних плаценти та їхнє застосування при найбільш розповсюдженій гінекологічній патології. Вперше проведено оцінку перспективності застосування різних похідних плаценти у медичній практиці на основі їх морфофункціональних характеристик; виявлено особливості механізмів кріоушкодження похідних плаценти в залежності від їхньої структури; показано, що в системі *in vitro* середовища, кондиційовані нативними та кріоконсервованими клітинами та експлантами плаценти підвищують метаболічну активність нейроклітин, органотипових культур маток, пригнічують її в культурах яєчників, спленоцитів та не впливають на метаболічну активність фібробластів. Вперше науково обґрунтовано і сформульовано особливості, показання та протипоказання до застосування похідних плаценти при гінекологічній патології.

Отримані результати можуть свідчити про терапевтичне застосування похідних плаценти при інфекційному процесі, передчасному виснаженні та ішемічному ураженні яєчників, синдромі полікістозних яєчників, антифосфоліпідному синдромі, операційній травмі.

За результатами дисертаційного дослідження сформульовано авторські основні положення, які виносяться на захист і містять елементи наукової новизни.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів.

У роботі поглиблено дослідження щодо визначення механізмів впливу похідних плаценти на жіночий організм в нормі, за патологій, показання та протипоказання до їхнього застосування в клініці, виявлення їх ефективності при різних гінекологічних захворюваннях. Це є вагомим теоретичним та практичним підґрунтям розуміння специфіки патофізіологічних процесів при гінекологічних розладах.

Розроблено і запропоновано біотехнології кріоконсервування та гіпотермічного зберігання тканин та тканинно-інженерних структур (патент України № 79009).

Запропоновано методи швидкої оцінки вихідного стану та збереженості після кріоконсервування, гіпотермічного зберігання ксплантів, сфероїдів з плаценти, які можуть застосовуватися для інших тканин і багатоклітинних комплексів. Ці методи є перспективними для використання у практиці низькотемпературних банків клітин, тканин та органів.

Визначено особливості кріоушкодження різних багатоклітинних структур, які дають змогу вдосконалювати методи кріоконсервування тканин, багатоклітинних конструкцій та створювати нові тканинно-інженерні конструкції більш резистентні до кріовпливу.

Визначено перспективні напрямки дослідження, доцільність та можливі протипоказання, побічні дії до застосування похідних плаценти при патології жіночої репродуктивної системи(патенти України №№ 91122, 107968).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

У дисертаційній роботі автором за мету було поставлено наукове обґрунтування біотехнології отримання та зберігання похідних плаценти для лікування гінекологічної патології. Відповідно до мети сформульовано завдання, які полягають у поглибленому аналізі похідних плаценти, які можуть бути застосовані в медичній практиці, виборі найбільш інформативних та прийнятних для застосування методів оцінки якості похідних, розробці біотехнологічних підходів до короткочасного зберігання, кріоконсервування та тривалого низькотемпературного зберігання похідних плаценти, з'ясуванні впливу нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на ізольовані компоненти жіночої статеві системи та систем її регуляції та визначенні перспективи розробки біотехнологій отримання та застосування похідних плаценти при лікуванні гінекологічної патології. Предметом дослідження обрано структурні та функціональні характеристики експлантів, що містять клітини плаценти при кріоконсервуванні та низькотемпературному зберіганні та їх вплив на перебіг експериментальної гінекологічної патології на моделях найбільш розповсюджених та соціально значущих захворювань.

Структура дисертації.

Структура дисертаційної роботи логічна, матеріали розділів викладено відповідно до мети і поставлених задач. Дисертаційну роботу викладено на 325 сторінках комп'ютерного тексту, проілюстровано 99 рисунками та 32 таблицями. Роботу оформлено традиційно: містить всі необхідні розділи, а саме: дві анотації (українською та англійською мовами), перелік умовних скорочень, вступ, огляд

літератури, матеріали і методи, результати досліджень з їх обговоренням, викладених у 3 розділах, аналіз та узагальнення результатів дослідження (заключення), висновки та список використаної літератури, що містить 327 посилань, джерел, з них 245—іноземні, 1 додаток.

В анотації автор стисло виклав основні положення та результати досліджень.

У Вступі обґрунтовано актуальність проблеми дисертаційного дослідження, сформульовано мету, завдання, об'єкт, предмет та методи дослідження. Висвітлено наукову новизну, теоретичне та практичне значення роботи. Наведено дані про особистий внесок, апробацію, впровадження результатів дослідження, структуру дисертації.

В огляді літератури (43 сторінки) зроблено вичерпний огляд сучасної літератури за темою, окреслено останні здобутки науковців в досліджуваній тематиці та раніше невідомі положення. Огляд включає роботи, опубліковані за останні 10-15 років, з них більшість англомовних. Матеріал викладено кваліфіковано, що свідчить про хороші знання автора предмету своїх досліджень. Узагальнення і висновки, які зроблено при аналізі цих даних, вміло використано автором при обговоренні результатів власних експериментів. *Зауважень до розділу немає.*

У розділі 2 «Матеріали та методи дослідження» (24 сторінки) дисертант детально описує всі методи та методологічні підходи, які було використано у дисертаційній роботі, із посиланням на джерело методу. Слід зазначити, що всі застосовані методи дослідження підібрані раціонально, підпорядковані загальній меті та завданням дослідження, є інформативними та сучасними. Розділ написаний чітко та логічно.

Наступні 3 розділи висвітлюють одержані автором результати.

У розділі 3 «Дослідження впливу факторів кріоконсервування, субнормотермічного та гіпотермічного зберігання на похідні плаценти» (73 сторінки) визначено температурний вплив на зберігання суспензії клітин плаценти. Визначено можливість субнормотермічного (20°C) зберігання клітин протягом 48 годин. В подальшому спостерігається різка втрата як кількості клітин, так і їх життєздатності. Максимальним строком зберігання, при якому можливе відновлення моношару, є 72 год. При гіпотермічному зберіганні (4°C) клітини зберігаються до 24 годин, після чого відновлення культури неможливе. При дослідженні режимів кріоконсервування визначено, що пряме занурення у рідкий азот викликає загибель клітин. Визначено, що для збереження культури при кріоконсервуванні з 10% ДМСО в середовищі культивування необхідно проводити повільне охолодження до температури не вище -40°C. Розроблено

загальну схему біотехнологічного процесу отримання та зберігання похідних плаценти. Визначено, що найбільш перспективними об'єктами для низькотемпературного банку є клітини плаценти та експланти, які добре зберігаються при кріоконсервуванні та в субнормотермічних та гіпотермічних умовах. Інші представлені об'єкти доцільно формувати з клітин плаценти вже після розморожування.

У **розділі 4** «Дослідження властивостей нативних та кріоконсервованих похідних плаценти в системі *in vitro*» (31 сторінка) представлені результати проведених досліджень свідчать, що при вивченні впливу похідних плаценти в ізольованих системах *in vitro* виявлено ряд закономірностей. Важливим є те, що вплив нативних та кріоконсервованих похідних плаценти не відрізняється між собою при дії на всі об'єкти, які були досліджені. Це підтверджує висновки попереднього розділу про можливість ефективного кріоконсервування та довгострокового зберігання похідних плаценти без значної зміни властивостей.

Показано, що *in vitro* клітини та експланти плаценти підвищують метаболічну активність нейроклітин, органотипових культур матки, пригнічують її в культурах яєчників, спленоцитів та не впливають на метаболічну активність фібробластів. Отримані дані дозволяють припустити, що механізми впливу похідних плаценти реалізуються через елементи нервової, імунної та репродуктивної системи, та їх застосування може бути доцільним при патології репродукції.

У **розділі 5** «Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на перебіг експериментальної гінекологічної патології» (39 сторінок) представлено результати, що характеризують кріоконсервовані експланти плаценти та можливо інші плацентарні біооб'єкти як перспективні щодо лікування або реабілітації при гінекологічних розладах, в патогенезі яких є ендокринопатія, аутоімунний компонент, яєчникова недостатність, ішемічний компонент. В той же час наявність гострого інфекційного або асептичного запалення в черевній порожнині є протипоказанням для застосування кріоконсервованих експлантів плаценти: гуморальні фактори, які виділяються після введення кріоконсервованих експлантів плаценти людини мишам-самицям мають позитивний трофічний ефект на матку та яєчники; відмічено позитивний вплив на саногенез при патологічних станах, пов'язаних із аутоімунними процесами, ендокринопатією та яєчковою недостатністю; підвищується ризик формування спайок, підсилюючи запалення у малому тазу, при цьому можлива активація інфекційного процесу чи формування трубноovarіального безпліддя.

В **узагальненні** обговорено і систематизовано великий обсяг всієї проведеної роботи, як теоретичної інформації, наведеної у огляді літератури, так і власних напрацювань автора та систематизації отриманих результатів.

Розділ побудований логічно та послідовно, містить обговорення отриманих автором результатів та їхнє порівняння з існуючими напрацюваннями інших вітчизняних та світових шкіл. Цей розділ підтверджує наукові положення, одержані дисертантом, та свідчить про високу наукову ерудицію автора.

У 9 наведених **висновках**, які базуються на отриманому фактичному матеріалі роботи і є теоретичним і практичним узагальненням проведених досліджень, представлені найважливіші результати, у повній відповідності до головної мети та завдань дослідження.

Перелік **використаних джерел літератури** містить 327 посилань, з них 245—іноземні, 1 додаток.

Повнота викладу основних результатів дисертації в опублікованих працях.

За результатами досліджень опубліковано 65 наукових праць, у тому числі 3 монографії, 22 статті у наукових фахових виданнях (18 українських, 4 закордонних; 12 статей, включених у міжнародні наукометричні бази даних *Scopus* та/або *Web of Science Core Collection*, Q1-3 статті, Q2-1, Q3-4, Q4-3; 7 категорії A), 32 тез доповідей в збірниках матеріалів конференцій, 3 статті у інших періодичних виданнях України, 5 патентів на корисну модель, які в достатній мірі висвітлюють результати роботи, що виносяться на захист.

Оцінка змісту дисертації.

Аналіз змісту опублікованої анотації засвідчує її відповідність основним положенням, викладеним у тексті дисертації. Анотація не містить інформації, яка була б відсутньою в дисертації. Анотацію та текст дисертації оформлено відповідно до вимог діючого Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 року № 261 «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів».

З аналізу змісту тексту дисертації офіційним опонентом вбачається дотримання здобувачем вимог академічної доброчесності в повному обсязі.

Дисертаційне дослідження В.Ю. Прокоп містить посилання на згадані у тексті джерела інформації в разі використання ідей, розробок, тверджень, відомостей. Автором дотримано вимоги норм законодавства про авторське право; надано повну і достовірну інформацію про результати наукової діяльності, а також використані методики досліджень.

У наданій дисертації не виявлено ознак академічного плагіату, самоплагіату, фабрикації, фальсифікації та інших порушень, що могли б поставити під сумнів самостійний характер виконаного дисертаційного дослідження.

Оцінюючи здобутки дисертації в цілому, слід відзначити, що В.Ю. Прокопюк виконав роботу, яка є завершеним дослідженням, що відкриває можливості для ефективного диференційованого застосування кріоконсервованих похідних плаценти при лікуванні експериментальної гінекологічної патології. Методичні підходи, що використано в роботі, є адекватними до поставлених завдань. Висновки роботи достатньо обґрунтовано і базуються на ретельно виконаних експериментах та їхній коректній інтерпретації, тому є достовірними.

Недоліки та зауваження щодо змісту дисертації.

В загальному, дисертаційна робота складає дуже приємне враження, написана цікаво, має чіткий логічний методологічний підхід до викладення матеріалу, багато і якісно ілюстрована. Зміст дисертації повною мірою розкриває суть проведеної роботи, її положень, результатів та визначеного наукового напрямку. Відзначаючи високий методичний та науковий рівень дисертаційної роботи В.Ю. Прокопюка, варто зазначити окремі зауваження та дискусійні питання:

1. У назві роботи закладено двозначність, адже робота є не клінічною, а біотехнологічною, тому коли йдеться про лікування гінекологічних захворювань, було б ліпше зазначити «лікування експериментальної гінекологічної патології».
2. В Україні існують дві структури, які головним чином працюють з кріоконсервацією кордової крові, це кріобанк «Гемафонд» і «Інститут клітинної терапії». Обидві установи працюють за стандартними методиками, затвердженими та сертифікованими. Для того, щоб підкреслити новизну роботи, було б доцільно порівняти ефективність стандартних та описаних у роботі підходів.
3. Результатом роботи не можуть бути сформовані «протипоказання і показання», а лише рекомендації для подальшої розробки підходів.
4. Швидкість згортання крові і тромбоцитопенія не є прямими симптомами АФС.
5. Між експериментальною роботою, виконаною на високому рівні, і застосуванням при гінекологічній патології – прірва. Але робота надає матеріал для побудови над нею надійного містка.
6. Стабізол дуже давно не випускають. У 2018 році його в Україні вже не було, тому я би радив не писати оригінальну назву, а зазначити 6% ГЕК.
7. Варто було б порівняти вартість нового розробленого методу, який потенційно є значно дешевшим, із вартістю сертифікованих методів.

У тексті дисертації зустрічаються описки, неточності,

Разом з тим, наголошую, що висловлені зауваження мають суто рекомендаційний характер і не зменшують високої оцінки викладеного матеріалу

Загальний висновок та оцінка дисертації. Дисертаційна робота Володимира Юрійовича Прокопюка «Біотехнологія отримання та низькотемпературного зберігання похідних плаценти для лікування гінекологічної патології» є цілісним, завершеним науковим дослідженням, в якому наведено теоретичне обґрунтування та експериментальне вирішення біотехнологічних проблем отримання, низькотемпературного зберігання похідних плаценти, їх ефективного диференційованого застосування при лікуванні експериментальної гінекологічної патології.

Актуальність обраної теми дослідження, обґрунтованість наукових положень, методичний рівень, достовірність одержаних результатів, повнота їх викладу в опублікованих працях свідчать про глибоку наукову самостійність автора, високий рівень підготовленості дослідження. За актуальністю, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів, глибиною розкриття поставлених проблем, логічністю і обґрунтованістю висновків дисертаційна робота повністю відповідає спеціальності 03.00.20 – біотехнологія та вимогам пунктів 7, 8, 9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України №1197 від 17 листопада 2021 року, а її автор Прокопюк Володимир Юрійович заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент

заступник директора з наукової роботи

завідувач відділу структури та функції білка

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

старший дослідник,

доктор біологічних наук

за спеціальністю «біотехнологія»

В.О. Чернишенко

