

## ВІДГУК

Офіційного опонента на дисертаційну роботу Дьоміної Марії Юріївни «Застосування кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин плаценти при лікуванні діабетичної ретинопатії (експериментальне дослідження)» на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук, представлену до захисту на засідання спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 Інституту проблем кріобіології і кріомедицині НАН України за фахом 14.01.35 – «кріомедицина»

**Актуальність дисертаційного дослідження.** На сьогоднішній день діабетична ретинопатія – це основна причина сліпоти людей у віці від 20 до 64 років. У світі неухильно зростає кількість хворих на цукровий діабет. Згідно зі статистичними даними експертів ВООЗ, лише за останні 10 років кількість людей, що страждають у всьому світі на цю недугу, зросла на 40 млн. осіб. Крім того, існують невтішні прогнози на майбутнє: це число може зрости до 300 млн. осіб до 2025 року.

Незважаючи на значний прогрес у лікуванні ускладнень з боку органу зору при цукровому діабеті, проблема профілактики і терапії діабетичної ретинопатії продовжує залишатися однією з найактуальніших у сучасній офтальмології. Вдосконалення методів спостереження за цими хворими, широке застосування сучасного профілактичного медикаментозного і лазерного лікування діабетичної ретинопатії не зупиняють зниження гостроти зору, слабкозорісті та сліпоті, що призводить до незворотних обмежень життєдіяльності.

Виходячи з цього, ведеться інтенсивний пошук засобів і методів, котрі дозволять уповільнити та стабілізувати метаболічні і морфологічні зміни у пацієнтів з ЦД. Розробляються різноманітні шляхи гальмування неоангіогенезу та апоптозу в лікуванні та профілактиці діабетичної ретинопатії. На сучасному етапі розвитку медицини привернула увагу можливість застосування кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин плаценти для корекції метаболічних порушень, а також антиангіогенної та нейропротекторної дії. Враховуючи вище зазначене, М.Ю. Дьоміна вибрала за мету роботи вивчення дії кріоконсервованих мезенхімальних клітин плаценти на динаміку основних метаболічних показників гомеостазу, рівень експресії генів VEGF і BDNF та морфологічні зміни у щурів з експериментальною діабетичною

ретинопатією. Вважаю тему досліджень, обрану М.Ю. Дьоміною безумовно актуальною.

**Зв'язок теми роботи з державними чи галузевими науковими програмами.** Дисертація виконана в межах науково-дослідницької роботи кафедри офтальмології ХМАПО «Функціональні, клінічні та морфологічні зміни при запальній та судинній патології органу зору, методи лікування» №0114U000522, а також науково-дослідницької теми ІПК і К НАН України «Вивчення впливу кріоконсервування на біологічні властивості стовбурових клітин різного походження при моношаровому і об'ємному культивуванні та експериментальній трансплантації» № 0112U003132.

**Новизна дослідження та одержаних результатів.** Досліджена експресія генів проангіогенного (VEGF) та нейротрофічного (BDNF) факторів росту при експериментальній патології сітківки ока. Показано, що у патологічно зміненій сітківці домінує експресія гена VEGF і визначається зменшення експресії гена BDNF.

На тлі застосування кМСКП відбувається збільшення експресії гена BDNF зниження експресії гена VEGF, що забезпечує нейропротекторний захист і антиангіогенний ефект.

Отримані результати доповнюють дані про механізми дії кМСКП, розширюють знання про процеси репараційної регенерації при ДР на фоні застосування препарату кМСКП.

Отримані нові дані про корекцію метаболічних розладів під дією кМСКП. Показана їх роль у нормалізації вуглеводного, проантиоксидантного, ліпідного статусу організму, що сприяє відновленню сітківки.

Вперше показано, що кМСКП не ідентифікуються в сітківці на ранніх стадіях непроліферативній ретинопатії, а відновлюючий ефект забезпечується збільшенням кількості BDNF.

Сформульовано етіопатогенетичне обґрунтування доцільності застосування кМСКП для лікування непроліферативної ДР.

**Практична значимість одержаних результатів.** Досліджена діабетична ретинопатія на фоні цукрового діабету 2 типу, індукованого висококалорійною дієтою та стрептозотоцином. Вивчені патологічні процеси на ранніх стадіях розвинення діабетичної ретинопатії. Вперше запропоновано використання кМСКП для лікування діабетичної ретинопатії.

На основі отриманих експериментальних даних доведена доцільність застосування кМСКП, що передбачає одноразове одномоментне внутрішньовенне й інтравітреальне введення.

Отримані дані використовуються в лекційних курсах на кафедрах: офтальмології Харківської медичної академії післядипломної освіти; офтальмології Харківського Національного медичного Університету; Одеського національного медичного університету; неврології з офтальмологією ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»; очних хвороб Запорізької медичної академії післядипломної освіти; оториноларингології з офтальмологією ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія»; загальної та клінічної імунології й алергології Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна.

### **Ступінь обґрунтування та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.**

Дисертаційна робота Дьоміної Марії Юріївни виконана на сучасному науково-методичному, клінічному та доказовому рівні. Зазначені здобувачем висновки базуються на проведених ним особисто експериментальних та клінічних дослідженнях. Дослідження проводили на моделі цукрового діабету 2 типу. Інсулінрезистентність моделювали за допомогою спеціальної висококалорійної дієти та стрептозотоцину. Експериментальні дослідження проведені на 30 щурах (60 очей), які були розділені на 5 груп. 1 група – інтактні тварини, 2 група – здорові тварини, яким було виконано як інтравітреальне так і внутрішньовенне введення кМСКП, 3 група – тварини з модельованою ДР без лікування, 4 група – тварини отримували внутрішньовенний та інтравітреальний препарат кМСКП і 5 група – тварини з модельованою ДР, які отримували збалансований розчин Хенкса. В роботі проведені біохімічні, морфологічні, молекулярні дослідження. Глюкозний гомеостаз оцінювали за показниками базальної глікемії, під час тесту толерантності до глюкози (3 г на кг маси тіла) і короткого інсулінового тесту (0,5 Од на кг маси тіла) (Lundholm L., Bryzgalova G. et al., 2008). Ліпідний обмін вивчали в сироватці крові на спектрофотометрі Shimadzu UV 1800 (Японія). Концентрацію фактора некрозу пухлини- $\alpha$  в сироватці крові експериментальних тварин визначали методом імуноферментного аналізу за допомогою наборів фірми «Вектор-Бест» (Росія). Також було проведено виділення та культивування мезенхімальних стромальних клітин (МСК) плаценти щурів, лентивірусну трансдукцію, кріоконсервовання МСКП, виділення РНК та проточну цитофлуориметрію. Для визначення рівня

експресії генів VEGF та BDNF в зразках сітківки очей щурів проводилася ПЛР у реальному часі (РЧ ПЛР). Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням комп'ютерної програми SPSS v.19.0 за допомогою наступних методів: первинної описової статистики, t-критерія Стюдента для незалежних вибірок, кореляційного і дисперсійного аналізу з обчисленням коефіцієнта кореляції Пірсона ( $r$ ) та критерію Фішера ( $F$ ). Перевірка на нормальність проводилася за критерієм згоди Колмогорова-Смирнова. Критичний рівень значимості ( $P$ ) для усіх перевіряємих статистичних гіпотез приймався рівним 0,05. Достовірність результатів не викликає жодного сумніву. Широке охоплення біохімічних і клінічних показників, їх характер, ретельна обробка матеріалу дозволяють вважати отримані дисертантом результати вірогідними. Усі наведені наукові положення, висновки і практичні рекомендації повністю відповідають поставленим задачам, логічно витікають із результатів дослідження, є завершеними і обґрунтованими.

**Оцінка змісту дисертації, її завершеність в цілому, зауваження щодо оформлення.** Дисертація написана російською мовою, викладена на 154 сторінках. Складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, розділу власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел. Містить 18 таблиць та 16 ілюстрацій. Список використаної літератури містить 333 джерела та викладений на 38 сторінках.

У вступі чітко сформульовані мета та задачі дослідження, наукова новизна та практичне значення отриманих результатів. Наведено вичерпне обґрунтування важливості та актуальності обраного автором напрямку для проведення наукових досліджень.

В огляді літератури проведено кваліфікований аналіз даних, отриманих в останній час по темі дисертації. Автор критично розглядає надруковані по проблемі наукові праці, результати яких є логічним обґрунтуванням актуальності та важливості роботи. Приведені сучасні погляди про стан проблеми пошуку нових методів лікування та профілактики діабетичної ретинопатії. Розглянуто властивості стромальних клітин та досвід їх застосування при цукровому діабеті. Розділ написано гарною літературною мовою, легко читається.

В розділі «Матеріали та методи дослідження» автор надає дані про експериментальних тварин, яким моделювали цукровий діабет 2 типу з розвитком ранньої стадії непроліферативної діабетичної ретинопатії та його

підтримання протягом всього дослідження. В розділі наведені дані про біохімічні, морфологічні молекулярні клінічні та статистичні методи дослідження, які були використані в дослідженні.

Результати дослідження наведені в 5 підрозділах. В першому підрозділі представлені результати дослідження метаболічних показників та вплив на них кМСКП. Досліджувався глюкозний гомеостаз щурів (рівень базальної та постпрандіальної глікемії, рівень фруктозаміну, площа під глікемічними кривими під час тесту толерантності до глюкози, коефіцієнт чутливості до глюкози), ліпідний профіль (загальні ліпіди, тригліцериди, неестерифіковані жирні кислоти, загальний холестерин), оксидативний статус (концентрація діє нових кон'югатів та глутатіону, загальна антиоксидантна активність, активність каталази), протизапальний стан (Концентрація С-реактивного білка та фактору некрозу пухлини- $\alpha$ ).

В другому підрозділі наведені дані про вивчення переднього відрізка ока та офтальмоскопічні дослідження очного дна щурів за допомогою фундус камери.

У третьому розділі описано патоморфологічні зміни очей тварин після введення кМСКП.

У четвертому розділі наведені результати молекулярно-біологічних досліджень експресії факторів росту VEGF та BDNF у щурів з експериментальним цукровим діабетом 2 типу.

У п'ятому розділі представлені результати кореляційного та дисперсійного аналізу показників, які показали взаємозв'язок метаболічних показників і ростових факторів та їх вплив на морфологію сітківки у експериментальних тварин

Результати власних досліджень пов'язані з загальною ідеєю дисертаційної роботи. В усіх розділах власних досліджень представлені оригінальні результати, які мають наукове та практичне значення. В заключному розділі проведено аналіз і узагальнення результатів дослідження.

Висновки відповідають поставленим задачам та логічно випливають з фактичного матеріалу.

Основні положення дисертації викладені в 8 наукових працях, з них 6 статей 5 у фахових журналах, 1 у закордонному виданні, 2 роботи у тезах науково-практичних конференцій.

Зміст автореферату і основних положень дисертації ідентичні.

**Запитання і зауваження :**

1. Чому кріоконсервовані мезенхімальні стромальні клітини плаценти не визначаються у тканинах сітківки експериментальних тварин?
2. Чи достатньо тільки внутрішньовенного введення препарату кМСКП для стабілізації течії діабетичної ретинопатії?
3. Чи достатньо тільки інтравітреального введення препарату експериментальним тваринам у порівнянні з комбінованим застосуванням?
4. У тексті роботи є стилістичні, орфографічні похибки, невдалі фразеологічні звороти. Вказані недоліки не носять принципового характеру, а зазначені зауваження не знижують загальної позитивної оцінки роботи.

**Висновок**

Дисертаційна робота Дьоміної Марії Юріївни «Застосування кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин плаценти при лікуванні діабетичної ретинопатії (експериментальне дослідження)» є завершеною самостійною роботою, яка за актуальністю, новизною, теоретичним і практичним значенням отриманих результатів, об'ємом виконаних досліджень, методичним рівнем, достатністю й повнотою опублікування основного змісту роботи відповідає вимогам пункту 11 «Порядку присудження наукових ступенів» затвердженого постановою Кабінета Міністрів України від 24.07.2013 № 567, а її автор може претендувати на присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.35 – кріомедицина.

Офіційний опонент  
д.мед.н., професор, завідувач кафедри  
офтальмології Харківського національного  
медичного університету



Бездітко П.А.