

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу Чуба Олега Володимировича

**«Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на дисциркуляторну
енцефалопатію в постменопаузі (експериментальне дослідження)»**

**за спеціальністю 14.01.35 – «кріомедицина» на здобуття вченого ступеню
кандидата медичних наук**

Дисертаційна робота Чуба Олега Володимировича присвячена експериментальному дослідженню впливу кріоконсервованих експлантів плаценти на перебіг дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі. Відомим фактом є збільшення випадків цереброваскулярних захворювань у літніх людей. Серед жінок різке збільшення неврологічних захворювань відбувається з настанням менопаузи та обумовлено дефіцитом естрогенів, дисбалансом гормонів та нейротрансмітерів. Посилюючись в постменопаузі, дефіцит жіночих статевих гормонів порушує метаболізм в організмі, приводить до дисфункції ендотелію судин, погіршенню реології крові, внаслідок чого розвивається хронічна ішемія мозку, яка викликає порушення в психоемоційній сфері, когнітивних процесах та знижує якість життя жінки та часто призводить до розвитку гострих порушень мозкового кровотоку. Фармакологічне лікування не завжди є ефективним, крім того нерідко викликає ускладнення. Тому актуальним є пошук нових методів лікування хронічних порушень мозкового кровообігу на тлі клімактеричних розладів у жінок.

Значна кількість клінічних та експериментальних наукових досліджень присвячена використанню стовбурових клітин в лікуванні кардіологічних захворювань, цілої низки прогресуючих дегенеративних захворювань нервової системи (хвороба Альцгеймера, бічний аміотрофічний склероз, нервово-м'язові атрофії та ін.), автоімунних захворювань нервової системи (розсіяний склероз) і показані значні досягнення в розробці таких методів лікування (Goradel NH et al., 2018, Duncan T et al., 2017, Gree BAC, Mares I, Hartung HP, 2019, Choi JR, Yong KW, Nam HY, 2019).

Також, не дивлячись на ряд досліджень, присвячених вивченню використання препаратів плацентарного комплексу в геронтології, до сьогодні не було обґрунтовано концепцію характеру їх біологічної дії та механізми реалізації терапевтичних ефектів. Враховуючи потужний стимулюючий ефект, використання плацентарних препаратів у жінок в постклімактеричному періоді представляється перспективним для корекції цілої низки порушень і стимуляції відновних процесів.

Обговорення можливостей корекції проявів дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі на експериментальній моделі, визначення морфологічних змін головного мозку після імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти (КЕП), дослідження поведінкових реакцій та когнітивних функцій, дослідження тривалості та якості життя експериментальних тварин дозволить розширити уявлення про можливості патогенетичного лікування дисциркуляторної енцефалопатії. Таким чином, в даний час проведення експериментального дослідження нейротрофічної та нейропротекторної дії КЕП при дисциркуляторній енцефалопатії в постменопаузі є актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в рамках науково-дослідної теми Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України 2.2.6.89 «Дослідження геропротекторної і геротерапевтичної дії кріоконсервованих плацентарних біооб'єктів», договорів № 2Н/11-14, № 2Н/11-15 і № 2Н/11-16 на виконання робіт зі збереження та забезпечення належного функціонування наукового об'єкта, що становить Національне надбання України, а також спільного україно-словацького наукового проекту. Здобувач є безпосереднім виконавцем окремих фрагментів досліджень.

Метою дисертаційної роботи стало визначення впливу кріоконсервованих експлантів плаценти на перебіг дисциркуляторної енцефалопатії у постменопаузі в експериментальних моделях. Шість наступних завдань для досягнення поставленої мети дослідження логічно і послідовно її розкривають.

Об'єкт і предмет дослідження сформульовані цілком вірно і відображують наукове завдання, що вирішує дисертант.

Ступінь досягнення мети та повнота викладення основних положень дисертації в наукових публікаціях. Ознайомлення з дисертаційною роботою дає підстави стверджувати, що дисертант досягнув поставленої мети. Автор достатньо коректно використовує відомі наукові методи обґрунтування отриманих результатів, висновків і рекомендацій. Сформульовані в дослідженні завдання розв'язані у повному обсязі. Автором науково обґрунтовано новий лікувально-профілактичний метод корекції дисциркуляторної енцефалопатії в перименопаузальний період за допомогою імплантації КЕП. На підставі детального аналізу функціонального стану нейроклітин при моделюванні глутаматної ексайтотоксичності, а також фізіологічних, нейрофізіологічних і морфологічних показників експериментальних тварин обґрунтовано доцільність та ефективність застосування КЕП для відновлення мікроциркуляції, проліферації ендотеліоцитів та нейрогенезу, а також поведінкових реакцій, когнітивних і адаптаційних функцій у мишей при моделюванні дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузальному періоді.

Окремі теоретичні положення та практичні рекомендації, розроблені на етапах виконання дисертації, проміжні та заключні висновки у достатній мірі відображено у наукових публікаціях. За матеріалами дослідження опубліковано 17 наукових праць, з них 5 статей у фахових виданнях, рекомендованих МОН України (3 – з них в виданнях, включених до міжнародної наукометричної бази SCOPUS), 5 – у збірках матеріалів конференцій (1 – за кордоном, 4 – в виданнях, включених до міжнародної наукометричної бази SCOPUS), 6 – в матеріалах міжнародних і національних конгресів, отримано 1 патент України на корисну модель. Результати роботи висвітлено на національних та міжнародних наукових форумах.

Наукова новизна дослідження полягає в тому, що вперше було виявлено нейропротекторну дію КЕП на культуру нервових клітин (НК) головного мозку. Автором вперше показано, що дія КЕП на тривалість та якість життя старіючих мишей залежить від статі тварин: введення КЕП самицям мишей не змінює тривалість їх життя, однак значуще збільшує виживання у репродуктивному віці, покращує показники орієнтаційно-дослідницької, зоосоціальної та анксиолітичної поведінки. В той час як імплантація КЕП самцям призводить до покращення тривалості їх життя, зовнішнього вигляду і фізичної сили, проте погіршуються поведінкові реакції та стресостійкість. Вперше в роботі визначено позитивні морфологічні зміни в гіпокампі та моторній корі самиць мишей в моделі досліджуваної коморбідної патології під впливом введення КЕП, що проявляється в відновленні цитоархітекtonіки, мікроциркуляторного русла, нейронів зовнішньої пластинки моторної кори і зубчастої звивини Амонової рогу гіпокампа. Вперше встановлено, що імплантація КЕП позитивно впливає на зміни орієнтаційно-дослідницької поведінки мишей, спостерігається істотне (на 56 %) збільшення часу дослідження нового об'єкта, що свідчить про відновлення когнітивних функцій у піддослідних тварин. На основі отриманих результатів автором вперше патогенетично обґрунтовано і розроблено метод корекції ДЕ в постменопаузі за допомогою імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти в експерименті.

Практичне значення отриманих результатів полягає в тому, що виявлена в роботі нейропротекторна дія КЕП на нервові клітини *in vitro* обґрунтовує використання середовищ, кондиційованих з КЕП, для ефективного відновлення культур НК в протоколах їх кріоконсервування і низькотемпературного зберігання. Встановлений позитивний вплив імплантації КЕП на фізичні показники, тривалість життя, поведінку, стресостійкість і когнітивні функції мишей в моделі ДЕ в ПМП з відновленням у них мікроциркуляції та цитоархітекtonіки в гіпокампі та моторній корі доводять перспективність використання КЕП для корекції цереброваскулярних змін в геріатричній

практиці та вдосконалення методів терапії ДЕ в ПМП. Отримані нові наукові дані про дію КЕП на експериментальних тварин з модельованою ДЕ в ПМП можуть бути використані в освітніх програмах з кріобіології, кріомедицини, геронтології, гінекології та неврології. Результати дослідження дозволили автору патогенетично обґрунтувати і розробити «Спосіб лікування когнітивних порушень при дисциркуляторній енцефалопатії в постменопаузі» (Патент України № 124910).

Дисертаційну роботу оформлено відповідно до вимог ДАК України. Вона викладена на 184 сторінках (з яких 146 сторінок – основної частини) і складається з анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, 4 розділів власних досліджень, узагальнення, висновків, практичних рекомендацій, списку літератури та 3 додатків. Список літератури містить 312 джерел, у тому числі 139 – кирилицею та 173 – латиницею. Робота ілюстрована 7 таблицями та 29 рисунками, в яких представлено 41 мікрофотографію.

Загальна характеристика роботи. Побудова, як власне дослідження, так і структури розділів дисертації є цілком послідовною та методологічно вірною. Матеріали наведено із суворим дотриманням принципів біоетики, згідно світових нормативних актів, а також з позицій доказової медицини.

У **вступі** представлені актуальність, мета, завдання, наукова новизна і практичне значення отриманих результатів. Автором докладно обґрунтовано актуальність та своєчасність проведеного дослідження, наведені дані особистого внеску, апробації результатів дослідження та висвітлення.

Огляд літератури складається з трьох частин. У першій наведені сучасні уявлення про етіопатогенез і принципи корекції дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі. У другій частині проаналізовані нейрофізіологічні процеси в постменопаузі і роль біологічно активних речовин в їх регуляції. У третій частині наведені дані про плацентарні біологічно активні речовини. Особливу увагу приділено причинам розвитку дисциркуляторної енцефалопатії у постменопаузі та їх зв'язку з рівнем нейротрофінів і нейротрансмітерів в цьому періоді. Огляд літератури всебічно описує сучасний стан вирішуваної проблеми, охоплюючи вітчизняні та зарубіжні джерела інформації. Крім того, автор наголосив на невирішених аспектах даної проблеми.

У розділі "**Матеріали і методи**" описані використані методи, що включали кріобіологічні і кріомедичні, сучасні методи дослідження при роботі з культурою нейроклітин, при моделюванні оваріоектомії і дисциркуляторної енцефалопатії, а також в нейрофізіологічних дослідженнях. Проводилися гістологічні дослідження моторної кори півкуль головного мозку та гіпокампа.

У **третьому розділі** автором було досліджено вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на метаболічну активність клітин мозку в моделі ексайтотоксичності.

Для вивчення дії чиників плацентарного походження (ЧПП) автором була обрана модель глутаматної ексайтотоксичності, тому, що саме ці порушення відіграють важливу роль в патогенезі ряду неврологічних захворювань (ішемія, травматичні ушкодження, нейродегенеративні захворювання) і є стандартним методом дослідження нейропротекторної активності ряду сполук, речовин, екстрактів, клітин і експлантів.

Було виявлено, що культивування в середовищах з додаванням ЧПП, призводить до збільшення метаболічної активності нервових клітин.

На підставі експериментального дослідження автором було встановлено, що специфічна концентрація, при якій глутамат виявляє ексайтотоксичний вплив на метаболічну активність нервових клітин, становить 10 ммоль, тому в наступних експериментах глутамат-індуковану цитотоксичність моделювали, використовуючи саме таку експериментально знайдену концентрацію глутамату.

Наступні дослідження дозволили автору довести, що метаболічна активність нервових клітин після культивування в середовищі DMEM, кондиційованому з КЕП, була більше, в порівнянні з глутамат-обробленими клітинами, на 20,6 %. Таким чином, позитивна терапевтична дія плацентарних чинників КЕП на нервові клітини була в два рази менше вираженою, ніж у випадку, коли нейроклітини культивували в середовищі, що містить плацентарні чинники до впливу глутамату.

Таким чином, автором було доведено, що ЧПП сприяють збільшенню метаболічної активності нервових клітин, характеризуються нейропротекторною та нейротрофічною (терапевтичною) дією. ЧПП, які піддавали нагріванню до 95 °C протягом 10 хвилин, не демонстрували захисної дії проти глутамат-індукованої цитотоксичності, що може вказувати на білкову або білок-асоційовану природу даних чинників, яка обумовлює термолабільність.

У **четвертому розділі** автором описані результати дослідження впливу імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти на тривалість і якість життя мишей.

Отримані дані визначили, що імплантація КЕП впливає на виживання та тривалість життя мишей, але ступінь і направленість дії біологічно активних речовин КЕП відрізнялися в залежності від статі та віку тварин. Продемонстровано, що імплантація кріоконсервованих експлантів плаценти збільшувала тривалість життя самців, однак погіршувала показники їх орієнтаційно-дослідницької, зоосоціальної та анксиолітичної поведінки. В той же час застосування КЕП у самиць не впливало на тривалість їх життя,

збільшувало їх виживання лише в репродуктивному віці, позитивно впливало на зоосоціальну, орієнтаційно-дослідницьку поведінку та значуще зменшувало рівень тривожності. Таким чином автор робить висновок, що вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на тривалість і якість життя мишей пов'язано як з впливом жіночих статевих гормонів в складі КЕП, так і інших плацентарних чинників. При цьому БАР, які синтезуються плацентою, впливаючи на механізми адаптації через відповідні сигнальні системи на молекулярному рівні, дають різні варіанти регулювання функцій організму від процесів метаболізму в клітині до системного впливу на організм тварин різного віку і статі.

П'ятий розділ присвячений дослідженню впливу імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти на поведінку, фізичний стан та структури головного мозку старіючих самиць мишей.

В першому підрозділі цього розділу автор встановив зміни в структурі поведінки піддослідних мишей при старінні в нормі. Серед змін в структурі орієнтаційно-дослідницької поведінки мишей при старінні було визначено, зміщення вертикальної активності в бік грумінгу у старіючих самців, що було пов'язане з дезорієнтацією в незнайомих умовах (тест „відкритого поля”) та значне вірогідне зростання тривожності у старіючих самиць.

Подальші експериментальні дослідження дозволили визначити, що після імплантації КЕП у старіючих самиць мишей переважала дослідницька поведінка (вірогідно зростала як горизонтальна, так і вертикальна форми локомоторної активності), зросла зоосоціальна активність, суттєво зменшився час, проведений в закритому відрізку хрестоподібного лабіринту.

В той же час автором встановлено, що імплантація КЕП старіючим самцям призводила до зниження вертикальної та горизонтальної локомоторної активності і зростання кількості актів грумінгу, зниження зоосоціальної активності і збільшення рівня тривожності. Тобто на відміну від старіючих самиць, у самців однорідної групи після імплантації КЕП приводила до розвитку дезадаптації.

У другому підрозділі автор наводить дані гістологічного дослідження області зубчастої звивини, Амонова рогу, гіпокампу і моторної кори, яка відповідає за рухові функції, оскільки вікові порушення когнітивних процесів асоційовані з морфологічними змінами в саме цих структурах головного мозку. Результати гістологічного дослідження дозволили автору довести, що в клітинах головного мозку старіючих мишей, яким були імплантовані КЕП, спостерігалися позитивні зміни: відновлення чисельності та щільності пірамідних нейронів зовнішньої пластинки моторної кори, зменшення кількості гіпохромних нейронів, відсутність гліозу, зменшення кількості нейронів гіпокампу з

дегенеративними змінами, а також посилення проліферації пірамідних нейронів гіпокампу, що є ознакою реактивації нейрогенезу. Автор робить висновок, імплантація КЕП старіючим мишам позитивно впливає на морфологію гіпокампу і моторної кори, поведінку старіючих самиць мишей, а також на здатність ЦНС тварин до адаптації в умовах стресу.

У **шостому розділі** наведені дані щодо вивчення ефективності застосування кріоконсервованих експлантів плаценти для корекції поведінкових реакцій, когнітивних функцій, морфологічних змін головного мозку у оваріоектомованих мишей. Автором показано, що введення КЕП позитивно впливає на зміни орієнтаційно-дослідницької поведінки мишей після оваріоектомії, наближаючи досліджувані показники до норми; покращує когнітивні функції головного мозку, підвищує коефіцієнт міжпівкульної асиметрії. При цьому морфологічні дослідження змін головного мозку мишей виявили ознаки відновлення мікроциркуляції і проліферації нейронів зовнішньої пластинки моторної кори і зубчастої звивини амонового рогу гіпокампу. Зроблено висновок про те, що імплантація КЕП сприяє поліпшенню адаптаційних можливостей ЦНС за рахунок відновлення балансу нейромедіаторів, нейротрофінів і інших БАР в головному мозку піддослідних тварин.

Розділ **Узагальнення і обговорення результатів** коротко підсумовує результати проведеної роботи та надає основні дані досліджень.

7 висновків, сформульованих дисертантом, відповідають поставленим завданням і впливають з отриманих результатів.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків, пропозицій. Дисертація О.В. Чуба виконана на належному методологічному рівні. Визначення завдання дослідження, формулювання його мети та завдань впливає з ретельного опрацювання літературних джерел; в роботі детально обговорено доречність всіх методів дослідження, визначено принципи проведення експериментальних досліджень, використано надійні методи статистичної обробки даних. Отримані в процесі роботи матеріали піддано всебічному аналізу. Це забезпечує належний рівень достовірності та обґрунтованості основних положень роботи. Слід зазначити, що дисертантом виконано великий обсяг експериментальної роботи з використанням інформативних, сучасних методів досліджень. Особливою цінністю дисертації є те, що її положення в достатній мірі обґрунтовані аналізом літературних даних і підтверджені адекватно обраними експериментальними моделями *in vitro* та *in vivo*. Положення, які можна віднести до фундаментальних – це виявлений взаємозв'язок морфологічних змін в ГМ і нейрофізіологічних функціональних змін, які відбулися після імплантації КЕП лабораторним тваринам. Вивчення

механізмів цих процесів може відкрити шлях до нових підходів у створенні біологічно активних препаратів для лікування ДЕ в постменопаузі.

Зміст і структура автореферату відповідають основним розділам і положенням роботи.

Разом з тим, є незначна кількість зауважень, що ні в якій мірі не знижують наукової та практичної цінності роботи. Наявна незначна кількість орфографічних та стилістичних помилок в тексті. У розділі "Огляд літератури" завеликий обсяг займає частина, що стосується опису протоколів лікування, можна було б обмежитись основними принципами терапії ДЕ в постменопаузі.

На фотографіях краще вказати масштабні лінійки замість збільшення.

При рецензуванні виникли питання дискусійного характеру:

1. Які з результатів проведених експериментів, з Вашої точки зору, доводять підвищення стійкості старих мишей до стресу після підсадки кріоконсервованих експлантів плаценти?
2. Які морфологічні ознаки впливу підсадки кріоконсервованих експлантів плаценти на стан головного мозку в відтворюваній модельній патології дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі Ви вважаєте найбільш значущими та як Ви це пояснюєте?

Питання та зауваження не змінюють загальну позитивну характеристику роботи. Основні наукові положення та висновки автора не підлягають сумніву.

Таким чином, дисертаційна робота Чуба Олега Володимировича «Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на дисциркуляторну енцефалопатію в постменопаузі (експериментальне дослідження)», є самостійним завершеним науковим дослідженням, яке за своєю актуальністю, обсягом проведених досліджень, методологічним рівнем, науковою новизною і практичним значенням повністю відповідає вимогам п. 11 «Положення про порядок присудження наукових ступенів» Міністерства освіти та науки України, що висуваються до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а її автор Чуб О.В. заслуговує присвоєння наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.35 – «кріомедицина».

Завідувач кафедри неврології № 2
Харківського національного
медичного університету,
доктор медичних наук, професор



О.Л. ТОВАЖНЯНЬСКА
О.Л. ТОВАЖНЯНЬСКА