

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Власова Олександра Олексійовича на тему: "Вплив екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят і фулерену C₆₀ на альтеративні та репаративні процеси в шкірі після кріодеструкції (експериментальне дослідження)",**
подану на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.35 – кріомедицина

1. Актуальність обраної теми.

Кріохірургічний метод, який ґрунтується на використанні низьких температур для деструкції патологічно змінених тканин, знайшов широке використання в практичній медицині. Кріоабляція застосовується в лікуванні кератозів, бородавок; доброякісних, передракових та злоякісних захворювань шкіри. Для контрольованого руйнування тканин важливим є моніторинг таких параметрів, як швидкість охолодження, цільова температура та експозиція впливу. До переваг кріоабляції відносять стимуляцію специфічного протипухлинного імунітету, низький ризик метастазування та знеболювальний ефект охолодження. У зв'язку з тим, що рани після кріодеструкції загоюються довше, ніж рани іншої етіології, скорочення термінів їх загоювання є актуальним науковим завданням.

Серед напрямків вирішення цього завдання можна виділити застосування терапевтичного потенціалу біологічно активних субстанцій природного походження та вуглецевих наноматеріалів, зокрема фулеренів C₆₀. Відомо, що екстракти кріоконсервованих фрагментів органів новонароджених поросят тканиноспецифічно стимулюють репаративну регенерацію при експериментальних патологічних станах. В науковій літературі все частіше з'являються данні, що фулерени C₆₀ проявляють протизапальні та антиоксидантні властивості на моделях патологічних процесів *in vivo*. Вплив фулеренів C₆₀ на біологічні системи залежить від дози, способу модифікації їх поверхні і концентрації у розчині, зокрема біологічні ефекти водних колоїдних розчинів залежать від розмірів агрегатів окремих молекул. Однак, відомості щодо токсичності та біологічної доступності фулеренів C₆₀ наразі є суперечливими. Є дослідження, де показана відсутність токсичності водних колоїдних розчинів немодифікованих фулеренів C₆₀.

Зважаючи на вищевказане, дисертаційна робота О.О. Власова, яка присвячена вивченню впливу екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят (ЕКФШП) та водного колоїдного розчину немодифікованих фулеренів C₆₀ (ВКРФ C₆₀) на процес загоєння ран після кріодеструкції шкіри, має теоретичну і практичну значущість.

Поставлені в роботі завдання відповідають меті і відображають тему дисертації.

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

Робота виконана у відділі експериментальної кріомедицини ІПКіК НАН України в рамках науково-дослідних тем: "Вплив низьких температур та екстрактів серця і селезінки на процеси некротизації і регенерації міокарду,

судин та хряща" (№ держреєстрації 0112U003133) і "Деструктивні та відновні процеси в тканинах *in vivo* після дії низьких температур та біологічно активних речовин" (№ держреєстрації 0117U000849).

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

Дисертаційна робота О.О. Власова базується на результатах експериментальних досліджень, при проведенні яких використовувалися якісно та кількісно репрезентативні матеріали досліджень (120 безшерстих щурів-самців 6-місячного віку і 42 безпородних білих щура-самця 6-місячного віку), і адекватні поставленим меті та завданням методи дослідження, з використанням сучасного устаткування. Дисертантом було використано такі інформативні методи, як спектрофотометричний, кріохірургічний, контактної термометрії, клінічного дослідження (планіметричний), гістологічні, лабораторні (гематологічні і біохімічні), з метою об'єктивізації даних морфологічного дослідження, активно застосовувались морфометричний та імуногістохімічний методи. Для обробки кількісних показників було обрано адекватні статистичні методи, які підтверджують достовірність результатів, наукових положень, висновків і рекомендацій, викладених у дисертації.

Висновки дисертації базуються на отриманих автором фактичному матеріалі, є логічними, і повністю відповідають поставленій меті і завданням.

Таким чином, обґрунтованість та достовірність наукових положень і висновків дисертації не викликають жодних сумнівів.

4. Наукова новизна одержаних результатів.

Результати які представлені у дисертації О.О. Власова безумовно мають наукову новизну. Вперше показано, що введення ЕКФШП та ВКРФ C_{60} після кріодеструкції шкіри прискорює загоювання ран, що проявляється зменшенням вираженості морфологічних проявів деструкції і запалення і збільшенням проявів репаративних процесів. Вперше доведено, що введення ВКРФ C_{60} тваринам після кріодеструкції шкіри призводить до дисбалансу регуляції ранового процесу – гіперстимуляції проліферації клітин зі зниженням їх апоптичної активності переважно в епітеліальному шарі і клітинах фібробластичного ряду. Вперше показано, що регенерація тканин за кріодеструкції шкіри після введення ЕКФШП є більш органотиповою, ніж після введення ВКРФ C_{60} , що проявляється формуванням придатків шкіри і більшою збалансованістю процесів апоптозу та проліферації. Вперше встановлено, що застосування ЕКФШП і ВКРФ C_{60} у тварин після кріодеструкції шкіри знижувало в сироватці крові рівень маркерів деструктивних та запальних процесів. Вперше встановлено, що внутрішньо очеревинне введення ВКРФ C_{60} в дозі 1 мг/кг з концентрацією 34,7 мкмоль/л викликало зворотній лейкоцитоз з підвищенням вмісту сегментоядерних нейтрофілів та зростання активності аспаратамінотрансферази і аланінамінотрансферази в сироватці крові щурів. Вперше встановлено, що застосування розчину ВКРФ C_{60} в концентрації 34,7 мкмоль/л та 173 мкмоль/л супроводжувалось помірним анізоцитозом еритроцитів на всі строки спостереження.

5. Практичне значення отриманих результатів. Розроблена експериментальна модель процесів деструкції і репарації тканин після кріоабляції шкіри у безшерстих щурів, яка придатна для вивчення процесів пато- та саногенезу після кріохірургічного лікування патологічних утворень шкіри. Отримані дані можуть знайти застосування при розробці нових патогенетично обґрунтованих підходів в лікуванні ран. На основі даних дослідження впливу ВКРФ С₆₀ на процеси перекисного окислення ліпідів та морфологічні показники деструктивних та відновних процесів в тканинах після кріоабляції шкіри, було розроблено спосіб лікування ран (патент України UA111022 U). Отримані дані щодо стимуляції фулеренами проліферації клітин на тлі зниження їх апоптичної активності можуть бути експериментальним обґрунтуванням доцільності проведення досліджень віддалених наслідків застосування ВКРФ С₆₀ на різних експериментальних моделях. Отримані дані можуть бути експериментальним обґрунтуванням доцільності проведення досліджень щодо можливості включення ЕКФШП в протоколи лікування ран.

6. Повнота викладення отриманих результатів у публікаціях.

Основні положення дисертації викладені в 19 наукових роботах: 5 статтях, опублікованих в фахових наукових виданнях (3 статті входять до наукометричної бази даних Scopus, 2 статті опубліковано в наукових періодичних виданнях Європейського Союзу), і в 13 тезах доповідей наукових конференцій. Отримано 1 патент України на корисну модель.

Отримані результати, основні положення дисертаційної роботи, повною мірою викладено в опублікованих працях.

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

Структура та оформлення дисертаційної роботи та її автореферату відповідають вимогам до оформлення дисертацій та авторефератів дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата наук ДАК МОН України. Робота викладена на 214 сторінках. Вона має вступ, основну частину, яка складається з шістьох розділів (огляд літератури, матеріали і методи дослідження, чотири розділи отриманих результатів та їх обговорення), узагальнення, висновки. Список використаної літератури складає 280 джерел і викладений на 29 сторінках. Дисертація інформативно проілюстрована 50 рисунками та 16 таблицями.

В **анотації**, відповідно до існуючих вимог, українською та англійською мовами наведені найбільш важливі результати досліджень, отриманих дисертантом. Виділена їх наукова новизна, практична значимість, надано список публікацій здобувача за темою дисертації.

У **переліку умовних скорочень** представлені усі умовні скорочення з їх розшифровкою.

Вступ викладений на 6 сторінках, містить усі необхідні складові, а саме: обґрунтування вибору теми дослідження; зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами; формулювання мети і завдань дослідження; визначення об'єкту і предмету дослідження; перелік використаних методів дослідження; формулювання наукової новизни та практичного значення

одержаних результатів; зазначення особистого внеску здобувача; перелік наукових конференцій, де були викладені та обговорені основні результати дослідження; інформація щодо публікацій дисертанта за матеріалами дисертації, структури і обсягу дисертації.

Розділ 1 "Огляд літератури" викладений на 23 сторінках і складається з п'яти підрозділів. В огляді літератури надано аналіз основних вітчизняних і закордонних наукових публікацій за темою дисертаційної роботи. Розділ побудовано логічно, матеріал викладено послідовно. При ознайомленні з цим розділом зрозуміло, що автор добре володіє інформацією з наукової проблеми, якої присвячена дисертація. Проаналізовано як класичні наукові роботи, так і сучасні експериментальні дослідження. Дисертантом доведено актуальність досліджень щодо удосконалення методичних підходів до стимуляції процесу регенерації тканин після кріодеструкції шкіри, використовуючи регуляторні властивості як речовин біологічного походження, таких як регуляторні пептиди, так і вуглецеві наноматеріали, такі як фулерени C_{60} .

Розділ 2 "Матеріали та методи дослідження" викладений на 13 сторінках і складається з двох підрозділів. Він має логічну, зрозумілу структуру та всю необхідну інформацію для розуміння методичної і методологічної бази дисертаційної роботи.

Результати власних досліджень та їх обговорення викладено в чотирьох розділах дисертації, наприкінці кожного з яких надано короткий висновок та зазначено публікації, в яких викладені матеріали даного розділу.

Розділ 3 "Розробка експериментальної моделі процесів деструкції та репарації після кріоабляції шкіри у безшерстих щурів" викладений на 18 сторінках і складається з трьох підрозділів. Параметри охолодження в процесі кріодеструкції шкіри відповідають вимогам до кріохірургічних технологій лікування. На 7 добу експерименту місцеві зміни в ділянці кріодеструкції виражалися розвитком ранового дефекту з наявністю зони первинного некрозу, демаркаційного лейкоцитарного валу, зони вторинного некрозу і тонкого шару грануляційної тканини. В той же час на системному рівні було виявлено розвиток окисного стресу, підвищення вмісту церулоплазміну і С-реактивного білка в сироватці крові піддослідних тварин. Отримані дані доводять, що представлена експериментальна модель придатна для вивчення процесів деструкції і репарації тканин після кріохірургічного лікування новоутворень шкіри.

Розділ 4 "Дослідження біологічних ефектів введення в черевну порожнину фулерену C_{60} у складі водного колоїдного розчину за впливом на гематологічні і біохімічні показники крові щурів" викладений на 10 сторінках і складається з трьох підрозділів. У цьому розділі наводяться результати дослідження гематологічних і біохімічних показників крові після введення різних концентрацій ВКРФ C_{60} інтактним щурам. Це дозволило дисертанту обрати для подальших досліджень дозу і концентрацію фулеренів в колоїдних розчинах.

Розділ 5 "Загоєння ран після кріодеструкції на фоні введення екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят та водного колоїдного розчину фулерену C₆₀" викладений на 60 сторінках і складається з трьох підрозділів. У розділі представлено макроскопічну і морфологічну характеристику ран після кріодеструкції шкіри у безшерстих щурів при лікуванні екстрактом кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят або водним колоїдним розчином немодифікованих фулеренів C₆₀. Слід підкреслити, що дисертантом проведено об'єктивізацію результатів за допомогою кількісної оцінки ключових для оцінки ранового процесу морфологічних показників: глибини зони первинного і вторинного некрозу, товщини демаркаційного лейкоцитарного валу, грануляційної або сполучної тканини в зоні регенерату, товщини епідермісу в крайових відділах ранового дефекту. Важливо, що результати світлової мікроскопії органічно доповнено даними імуногістохімічного дослідження шкіри з підлягаючими м'якими тканинами (з використанням моноклональних антитіл до маркерів Ki-67 та p53), що дозволило оцінити процеси проліферації та апоптозу в зоні регенерату. Аналіз отриманих результатів дозволяє дисертантові зробити висновок, що введення ЕКФШП або ВКРФ C₆₀ тваринам після кріодеструкції шкіри сприяє збільшенню швидкості загоєння ран, при цьому регенерація після застосування ЕКФШП є більш органотиповою, а введення ВКРФ C₆₀ призводить до дисбалансу процесів проліферації та апоптозу в тканинах, оточуючих рановий дефект.

Розділ 6 "Біохімічні показники крові щурів з кріодеструкцією шкіри та введенням екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят і водного колоїдного розчину фулеренів C₆₀" викладений на 19 сторінках і складається з двох підрозділів. Перший підрозділ присвячено вивченню стану прооксидантної та антиоксидантної систем в сироватці крові піддослідних тварин, за вмістом дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів, та активністю каталази і супероксиддисмутази. У другому підрозділі наводяться дані щодо вмісту в сироватці крові С-реактивного білка, церулоплазміну, молекул середньої маси, нітратів і нітритів. Аналіз отриманих результатів дозволяє дисертантові зробити висновок, що внутрішньоочеревинне введення ЕКФШП або ВКРФ C₆₀ після кріодеструкції шкіри знижувало рівень маркерів деструктивних та запальних процесів в сироватці крові.

Розділ "Аналіз та узагальнення" викладений на 8 сторінках, та логічно підсумовує результати експериментального дослідження. Аналіз та узагальнення результатів дисертаційного дослідження проведено на високому науковому рівні.

Висновки містять узагальнюючий та 5 окремих висновків дисертаційного дослідження, які логічно підсумовують отримані дисертантом результати та відображають основний зміст роботи. Висновки є достатньо обґрунтованими, відповідають меті і завданням дослідження.

8. Визначення ідентичності змісту автореферату й основних положень дисертації.

Автореферат повністю відображає зміст основних положень дисертації.

9. Зауваження і питання для обговорення.

В цілому дисертація О.О. Власова справляє позитивне враження. Зауваження, приведені нижче, не є принциповими і не знижують науково-практичної цінності дисертаційної роботи.

1. У тексті дисертації іноді зустрічаються невдалі стилістичні обороти та друкарські помилки.

2. На стор. 121 наведено рис. 5.29, де показано поверхневі відділи грануляційної тканини, що заповнює рановий дефект, опис якого представлено лише в тексті роботи. Підрисунковий підпис доцільно було б доповнити стислим поясненням.

При аналізі дисертаційної роботи виникли деякі питання дискусійного характеру.

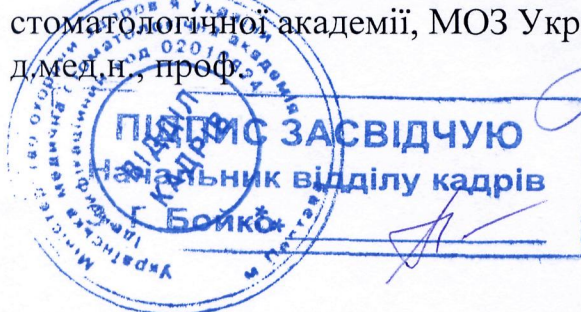
1. В своїй роботі ви обрали внутрішньо очеревинне введення ЕКФШП експериментальним тваринам. Чому ви обрали саме системне введення і які, на вашу думку, перспективи місцевого застосування ЕКФШП?

2. Чому, дані, отримані при розрахунку індексу співвідношення Кі-67/p53 позитивних клітин, наведені у розділі 5, підрозділі 5.3, не піддавали статистичній обробці?

10. Висновок Таким чином, дисертаційна робота Власова Олександра Олексійовича "Вплив екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят і фулерену C_{60} на альтеративні та репаративні процеси в шкірі після кріодеструкції (експериментальне дослідження)" є закінченою самостійною науковою роботою, яка за своєю актуальністю, новизною, науковою і практичною значимістю, рівню завдань, що були поставлені, об'єму проведених досліджень, обґрунтованістю висновків і основних наукових положень, повністю відповідає вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук, згідно п.11 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (із змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р.; № 1159 від 30.12.2015 р., № 567 від 27.07.2016 р.) та наказу МОН України №40 від 12.01.2017 р. "Про затвердження Вимог до оформлення дисертації". Тому вважаю, що Власов Олександр Олексійович заслуговує на присудження йому наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.35 – кріомедицина.

Офіційний опонент

Завідувач кафедри гістології, цитології та ембріології Української медичної стоматологічної академії, МОЗ України
д.мед.н., проф.



В.І. Шепітько