

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Власова Олександра Олексійовича
«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

Актуальність теми.

Дисертаційна робота О.О. Власова присвячена дуже важливій проблемі, яка залишається актуальною протягом багатьох років, – проблемі лікування ран, які виникають після кріодеструкції шкіри. Відомо, що рани після кріодеструкції загоюються довше, ніж рани іншої етіології, тому скорочення термінів їх загоювання та, як наслідок, скорочення термінів перебування хворих на стаціонарному лікуванні і реабілітації є актуальним науковим завданням.

Одним з напрямків вирішення цього завдання може бути використання терапевтичного потенціалу біологічно активних субстанцій природного походження та вуглецевих наноматеріалів. Відомо, що екстракти кріоконсервованих фрагментів органів новонароджених поросят тканиноспецифічно стимулюють репаративну регенерацію при експериментальних патологічних станах, таких як інфаркт міокарда, токсичний гепатит, цироз печінки та ін. На відміну від препаратів із нативних клітин, які містять високомолекулярні пептиди і фрагменти клітинних мембран, водно-сольові тканинні екстракти практично не викликають сенсibiliзації і алергічних реакцій.

Є дані, що фулерени C₆₀ та їх похідні проявляють протизапальні та антиоксидантні властивості на моделях патологічних процесів *in vivo*. Однак, відомості щодо токсичності та біологічної доступності фулеренів C₆₀ наразі є суперечливими. Вплив фулеренів C₆₀ на біологічні системи залежить від дози, способу модифікації їх поверхні та клітин мішеней. Зокрема, біологічні ефекти

водних колоїдних розчинів фулерену залежать від їх концентрації та розмірів агрегатів окремих молекул. В ряді публікацій показана відсутність токсичності водних колоїдних розчинів немодифікованих фулеренів C_{60} .

Виходячи з вищесказаного, дисертація Власова Олександра Олексійовича, яка присвячена вивченню впливу екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят та водного колоїдного розчину немодифікованих фулеренів C_{60} на процес загоєння ран після кріодеструкції шкіри, безумовно, є актуальною науковою роботою.

Поставлені в роботі завдання відповідають меті і відображають тему дисертації.

Зв'язок дисертаційної роботи з державними 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).

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

Обґрунтованість та достовірність наукових положень, результатів і висновків дисертації О.О. Власова забезпечена представленням якісно та кількісно репрезентативного матеріалу досліджень (120 безшерстих щурів-самців 6-місячного віку і 42 безпородних білих щура-самця 6-місячного віку); коректним і кількісно достатнім розподілом тварин на групи; коректним використанням загальноприйнятих сучасних методів дослідження. Застосування таких методів, як спектрофотометричного, кріохірургічного, контактної термометрії, клінічного дослідження (в тому числі планіметричного), лабораторних (гематологічних, біохімічних), гістологічних (в тому числі: морфометричних, імуногістохімічних) відповідають меті та

завданням роботи. Всі дані проаналізовані з використанням адекватних методів статистичної обробки, що робить їх значимими й достовірними.

Висновки дисертації базуються на отриманих автором фактичному матеріалі, є логічними, і повністю відповідають поставленій меті і завданням. Таким чином, обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, є незаперечними.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше показано, що введення ЕКФШП та ВКРФ С₆₀ 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 С₆₀ тваринам після кріодеструкції шкіри призводить до дисбалансу регуляції ранового процесу – гіперстимуляції проліферації клітин зі зниженням їх апоптотичної 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 С₆₀, що проявляється формуванням придатків шкіри і більшою збалансованістю процесів апоптозу та проліферації.

Вперше встановлено, що застосування ЕКФШП і ВКРФ С₆₀ у тварин після кріодеструкції шкіри знижувало в сироватці крові рівень маркерів деструктивних та запальних процесів.

Вперше встановлено, що інтраперитоніальне введення ВКРФ С₆₀ в дозі 1мг/кг з концентрацією 34,7 мкмоль/л викликало зворотній лейкоцитоз з підвищенням вмісту сегментоядерних нейтрофілів та зростання активності аспаратамінотрансферази (АСТ) і аланінамінотрансферази (АЛТ) в сироватці крові щурів.

Вперше встановлено, що застосування розчину ВКРФ С₆₀ в концентрації 34,7 мкмоль/л та 173 мкмоль/л супроводжувалось помірним анізоцитозом еритроцитів на всі строки спостереження.

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 C₆₀ на процеси перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) 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 апоптотичної активності можуть бути експериментальним обґрунтуванням доцільності проведення досліджень віддалених наслідків застосування ВКРФ C₆₀ на різних експериментальних моделях. Отримані дані можуть бути експериментальним обґрунтуванням доцільності проведення досліджень щодо можливості включення ЕКФШП в протоколи лікування ран.

Повнота викладу отриманих результатів у публікаціях.

Основні положення дисертації викладені в 19 роботах. Опубліковано 5 статей в індексованих фахових наукових виданнях, 3 з яких входять до наукометричної бази даних Scopus (2 статті - опубліковано в наукових періодичних виданнях за межами України) і 13 тез доповідей. Отримано 1 патент України на корисну модель.

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

Зміст автореферату і основних положень дисертаційної роботи є ідентичним.

Структура, обсяг і зміст дисертації.

Дисертація побудована за класичним зразком, відповідно до вимог 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 містить 50 рисунків та 16 таблиць.

Матеріал дисертації викладено у логічній послідовності та в доступному для сприйняття стилі, чіткою мовою, прийнятою в науковому суспільстві.

«Вступ» містить усі необхідні підрозділи. В розділі дисертантом обґрунтовано актуальність обраної теми, чітко сформульовані мета і задачі роботи, об'єкт та предмет дослідження, наукова новизна і практичне значення одержаних результатів та особистий внесок здобувача в наукові роботи, які опубліковано в співавторстві.

У розділі **«Огляд літератури»** представлено аналіз експериментальних і теоретичних даних, які стосуються уявлень про застосування низьких температур в медицині, а саме кріохірургії шкіри. Наведено інформацію про сучасний стан проблеми лікування ран, а також досвід застосування регуляторних властивостей як речовин біологічного походження, таких як регуляторні пептиди, так і вуглецевих наноматеріалів, таких як фулерени C₆₀. На підставі результатів аналізу літератури доведено актуальність досліджень щодо удосконалення методичних підходів до стимуляції процесу регенерації тканин після кріодеструкції шкіри.

Розділ **«Матеріали та методи дослідження»** має чітку структуру, викладений у зручному для сприйняття стилі. Обґрунтованість та достовірність наукових положень, результатів і висновків дисертації забезпечена коректним вибором і використанням сучасних методів досліджень та обладнання. Застосовані в роботі методи (кріохірургічний, контактної термометрії, клінічного дослідження (в тому числі планіметричний), лабораторні (гематологічні, біохімічні), гістологічні (в тому числі: морфометричні, імуногістохімічні), спектрофотометричний, статистичні) дали змогу виконати дисертацію на високому науковому рівні.

Результати власних досліджень викладено в чотирьох розділах.

В розділі **«Розробка експериментальної моделі процесів деструкції та репарації після кріоабляції шкіри у безшерстих щурів»** було представлено експериментальну модель, придатну для вивчення процесів, що виникають

після кріохірургічного лікування новоутворень. Параметри охолодження відповідали вимогам до кріохірургічних технологій лікування.

В розділі «Дослідження біологічних ефектів введення в черевну порожнину фулерену C_{60} у складі водного колоїдного розчину за впливом на гематологічні і біохімічні показники крові щурів» на 1 та 5 добу експерименту вивчались гематологічні і біохімічні показники крові після введення різних концентрацій ВКРФ C_{60} інтактним щурам, що дозволило обрати відповідну дозу і концентрацію фулеренів в колоїдних розчинах для подальших досліджень.

В розділі «Загоєння ран після кріодеструкції на фоні введення екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят та водного колоїдного розчину фулерену C_{60} » наводяться результати макроскопічної оцінки ран та світлової мікроскопії препаратів шкіри та підлягаючих м'яких тканин у експериментальних тварин на 7, 14 та 21 добу експерименту. Дисертантом була проведена кількісна оцінка морфометричних 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. Також автором було проведено імуногістохімічне 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. Такий комплекс досліджень дозволив об'єктивізувати результати. Проаналізувавши отримані данні, автор робить висновок, що застосування ЕКФШП та ВКРФ C_{60} прискорює загоювання ран після кріодеструкції шкіри, при цьому регенерація тканин після введення ЕКФШП була більш органотиповою. При застосуванні ВКРФ C_{60} дисертантом було виявлено дисбаланс процесів проліферації і апоптозу в тканинах зони регенерату.

В розділі «Біохімічні показники крові щурів з кріодеструкцією шкіри та введенням екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят і водного колоїдного розчину фулеренів C_{60} » наводяться результати

біохімічних досліджень сироватки крові щурів після кріодеструкції шкіри і введення ЕКФШП або ВКРФ С₆₀. На 7, 14 та 21 добу спостереження було проведено визначення концентрації дієних кон'югатів, ТБК-активних продуктів, церулоплазміну, С-реактивного білка, молекул середньої маси, нітратів, нітритів, активності супероксиддисмутази і каталази в сироватці крові. Аналіз отриманих результатів дозволив авторів зробити висновок, що застосування ЕКФШП та ВКРФ С₆₀ знижувало в сироватці крові рівень маркерів деструктивних та запальних процесів.

Аналіз та узагальнення результатів дисертаційного дослідження проведено на високому науковому рівні. Висновки повністю відповідають поставленій меті і завданням роботи та логічно впливають з проведених досліджень.

Зауваження і питання для обговорення.

Принципових недоліків і зауважень у змісті та оформленні дисертаційної роботи О.О. Власова не виявлено. Деякі зауваження, що виникли в процесі рецензування, не впливають на загальну позитивну оцінку роботи:

1. Посилання на літературні джерела, які наведено в тексті основного змісту дисертації у квадратних дужках, не завжди наведено в порядку зростання порядкового номеру.

2. Текст дисертації містить поодинокі орфографічні та друкарські помилки.

3. На стор. 53 на Рис.2.1 наведено схему пристрою для моделювання кріодеструкції шкіри. Підпис під рисунком було б доцільно доповнити пояснювальними даними з цифровим маркуванням елементів пристрою.

У процесі рецензування роботи у мене виникли питання, які мені хотілося б обговорити з дисертантом у порядку дискусії.

1. Чому ви вирішили в своїй роботі розробити оригінальну експериментальну модель процесів деструкції і репарації після кріоабляції шкіри?

2. В розділі «матеріали і методи» описана методика отримання зразків

крові у щурів, звідки ви її взяли, і чи є вона оригінальною? Чому ви вирішили обрати саме її?

3. Як ви проводили макроскопічну оцінку ран в своїх дослідженнях?

Висновок Таким чином, дисертаційна робота О.О. Власова «Вплив екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят і фулерену C₆₀ на альтеративні та репаративні процеси в шкірі після кріодеструкції (експериментальне дослідження)» є самостійною завершеною актуальною науковою роботою, яка виконана на сучасному науково-методичному рівні, містить раніше не захищені наукові положення, що в сукупності вирішує актуальне наукове завдання щодо оптимізації лікування ран після кріодеструкції шкіри.

За актуальністю, високим методичним рівнем, обсягом досліджень, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням отриманих результатів, їх вірогідністю, обґрунтованістю висновків і основних наукових положень дисертаційна робота Власова Олександра Олексійовича «Вплив екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят і фулерену C₆₀ на альтеративні та репаративні процеси в шкірі після кріодеструкції (експериментальне дослідження)» 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. та наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», а її автор заслуговує на присвоєння йому наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.35 – кріомедицина.

Офіційний опонент:

завідувач кафедри комбустіології,

реконструктивної та пластичної хірургії

Харківської медичної академії

післядипломної освіти МОЗ України,

д.мед.н., професор



Олійник Г. А.