

ВІДЗИВ

офіційного опонента, доктора медичних наук, професора Стуса Віктора Петровича на дисертаційну роботу Антоняна Ігоря Михайловича “Застосування клітин стромы кісткового мозку для лікування еректильної дисфункції на тлі андрогенного дефіциту (експериментально-клінічне дослідження)”, поданої на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.01.06-урологія

Актуальність обраної теми дисертації. Робота представляє інтерес і має велику медико-соціальну актуальність. Еректильна дисфункція виявляється у 52% чоловіків у віці 40–70 років, а при наявності цукрового діабету розвивається в три рази частіше і на 10-15 років раніше, особливо при у хворих з підвищеною вагою. Встановлено, що чоловіки з ЕД мають більший ризик смертності від серцево-судинних захворювань, зокрема, від інфаркту міокарда.

Еректильна дисфункція та андрогенний дефіцит є дуже поширеними станами, які на цей час виявляються не тільки в чоловіків похилого та старечого віку, але й у більш молодих чоловіків репродуктивного віку. Зниження концентрації тестостерону спричиняє розвиток різноманітних порушень в організмі чоловіка. Найбільш помітним результатом дефіциту тестостерону є сексуальні розлади, зокрема, ЕД та безпліддя. В свою чергу, ЕД та інфертильність є однією з причин безплідних браків, що надає проблемі дефіциту тестостерону великого соціального значення.

Лікування еректильної дисфункції у хворих з гіпогонадізмом тільки інгібіторами ФДЕ-5 не завжди ефективно та потребує додаткової гормон-замісної терапії, яка при застосуванні екзогенного тестостерону має багато обмежень. Більш фізіологічним та патогенетично виправданим є клітинне відновлення регенераційного потенціалу паренхіми яєчок за допомогою клітин стромы кісткового мозку. Але цей метод лікування при дефіциті тестостерону

ще не знайшов достатнього обґрунтування в аспекті вибору способу культивування стовбурових клітин, ефективного дозування та методу введення й потребує подальшого удосконалення та створення експериментальної моделі андрогенного дефіциту з вивченням динаміки системних та місцевих патологічних змін.

Усе вищевикладене визначило актуальність і практичну значущість наукової роботи і стало підґрунтям для проведення даного дослідження, оскільки вирішення вищевказаних клінічних проблем дозволить деталізувати показання до різних методів лікування та покращити результати лікування хворих на еректильну дисфункцію з андрогенним дефіцитом.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом НДР ХМАПО «Експериментальне вивчення терапевтичного потенціалу інтактних та індукованих стромальних клітин кісткового мозку та жирової тканини, їх використання в створенні тканевої інженерних конструкцій та в якості моделі для вивчення молекулярних механізмів та перспективних методів терапії деяких генетичних захворювань» № державної реєстрації 0114U000514 (2014–2016 рр.).

Мета дослідження поліпшення ефективності лікування еректильної дисфункції на тлі дефіциту тестостерону у хворих з цукровим діабетом та надлишковою масою тіла шляхом експериментальної розробки та клінічної апробації методу клітинної терапії із застосуванням клітин строми кісткового мозку. В ході роботи над дисертацією її мета була повністю розкрита та досягнута.

Методи дослідження цілком відповідають поставленим завданням, вимогам сучасної науки та є достатніми для отримання якісних результатів.

Наукова новизна дослідження та одержаних результатів. Отримані під час дослідження нові дані було сформульовано у вигляді наукових положень, з якими цілком погоджуюсь і підтверджую їхню цінність та обґрунтованість.

Визначені здобувачем основні наукові положення і висновки ґрунтуються на результатах обстеження та лікування експериментальних тварин з експериментальним гіпогонадизмом та чоловіків з еректильною дисфункцією та андрогенною недостатністю на тлі ЦД 2-го типу й надлишковою вагою, що були отримані шляхом використання сучасних інформативних методів дослідження.

Автором удосконалено експериментальну модель пригнічення копулятивної поведінки на тлі андрогенного дефіциту з використанням хлориду кадмію та доведено можливість досягнення необхідного гонадотоксичного ефекту зі стабільним зниженням рівня тестостерону без суттєвого впливу на гіпоталамо-гіпофізарну вісь статевих гормонів та з відсутністю виразного загальнотоксичного ефекту.

Виявлено, що одноразове інтраперитонеальне введення експериментальній тварині стерильного розчину хлориду кадмію у дозі 150 мкг/100 г маси тіла призводить до виникнення стабільного андрогенного дефіциту зі збереженням цього стану на 28-у добу експерименту.

Доведено, що запропонована модель експериментального андрогенного дефіциту спричиняє деструктивні зміни сім'яних каналців з частковим заміщенням інтерстиціальної тканини сполучною тканиною та ознаками надмірної проліферації клітин Лейдіга з ознаками морфофункціональної недостатності, що свідчить про виснаження регенераційного потенціалу та можливе зменшення кількості стовбурових клітин, необхідних для відновлення тестостерон-продукуючих клітин Лейдіга.

Розроблено й застосовано методику клітинної терапії експериментального андрогенного дефіциту із застосуванням інтратестикулярної трансплантації клітин стромы кісткового мозку (КСКМ), та доведено, що найбільший клінічний ефект спостерігається при введенні 200000 КСКМ в обидва яєчка (уздовж їх найбільшої вісі).

Визначено, що інтратестикулярне введення дослідним тваринам КСКМ за запропонованим методом спричиняє відновлення рівня тестостерону та

нормалізації інших статевих гормонів водночас з нормалізацією наслідків загальнотоксичної дії хлориду кадмію (активності АЛТ, АСТ, каталази та супероксиддисмутази - СОД).

За результатами гістологічного дослідження визначено, що під впливом клітинної терапії із застосуванням КСКМ відбувається відновлення морфологічної структури сім'яників та морфометричних показників клітин ячок експериментальних тварин з наявністю різних етапів диференціювання сперматид та нормохромних клітин Лейдіга у навколосудинній стромі.

Запропоновано методику отримання КСКМ, що перманентно експресують зелений флюоресцентний білок GFP, за допомогою якого встановлено розташування та розподіл КСКМ в інтерстиції після їх інтратестикулярної трансплантації. Зареєстровано й констатовано достатню приживлюваність КСКМ після інтратестикулярної трансплантації.

За результатами гістологічного дослідження сім'яників та передміхурової залози експериментальних тварин з андрогенним дефіцитом доведено, що у віддаленому періоді після інтратестикулярної трансплантації КСКМ їхня морфоструктура не відрізняється від структури інтактних тварин аналогічного віку.

Уперше здійснено клінічну апробацію запропонованого методу клітинної терапії із застосуванням КСКМ у пацієнтів з еректильною дисфункцією та гіпогонадізмом на тлі цукрового діабету та надлишкової ваги.

Уперше доведено ефективність клітинної терапії із застосуванням КСКМ у лікуванні еректильної дисфункції та гіпогонадізму, про що свідчить позитивна динаміка показників еректильної функції за шкалою МІЕФ-5, концентрації статевих гормонів та показників вуглеводного та жирового метаболізму.

Отже, основні наукові положення та висновки автора є достовірними.

Практичне значення отриманих результатів обумовлене розробкою і впровадженням способів: 1) моделювання андрогенного дефіциту у самців

білих щурів, який дозволяє досягти стійкого патологічного стану та легко відтворюється, що дає можливість застосувати його для створення експериментального гіпогонадизму; 2) отримання КСКМ, що експресують зелений флюоресцентний білок GFP, який дозволяє простежувати розподіл трансплантованих клітини протягом тривалого періоду; 3) методу клітинної терапії у поєднанні з інгібіторами ФДЕ-5, який дозволяє нормалізувати рівень тестостерону та відновити еректильну функцію й може бути перспективним для лікування чоловіків з ЕД та гіпогонадизмом, які бажають зберегти фертильність.

Результати роботи впроваджено у медичні спеціалізовані заклади України.

Теоретичне значення полягає у новому вирішенні питання поліпшення ефективності лікування еректильної дисфункції на тлі дефіциту тестостерону у хворих з цукровим діабетом та надлишковою масою тіла шляхом експериментального розроблення та клінічної апробації методу клітинної терапії із застосуванням клітин строми кісткового мозку.

Ступінь обґрунтованості основних наукових положень і висновків, сформульованих у дисертації. Сформульовані у дисертаційній роботі Антоняна І.М. основні наукові положення і висновки базуються на достатній кількості спостережень – експериментальних 314 самцях білих щурів та 20 хворих з еректильною дисфункцією та андрогенною недостатністю на тлі ЦД 2-го типу й надлишковою вагою, які знаходилися на обстеженні та лікуванні в умовах КНП ХОР «Обласний медичний клінічний центр урології і нефрології імені В.І. Шаповала».

Отримані при експериментальних та клінічних дослідженнях дані оброблялися за допомогою пакета статистичних програм SPSS for Windows Release 19,0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois) з урахуванням рекомендацій до медико-біологічних досліджень.

Повнота викладених матеріалів дисертації в опублікованих роботах і авторефераті. За темою дисертації опубліковано 42 друковані роботи, у тому числі 28 статей у спеціалізованих наукових виданнях (з яких 1 стаття – у журналі, що входить до міжнародної наукометричної бази Web of Science, 9 – у виданнях, які входять до наукометричних баз даних, 12 статей – одноосібно), 8 тез доповідей у матеріалах науково-практичних конференцій, 1 методичні рекомендації, 5 патентів України на корисну модель.

Автореферат дисертації повністю відображає зміст самої дисертації та оформлений згідно вимогам для докторських дисертацій.

Оцінка змісту дисертації. Дисертаційна робота Антоняна І.М. є багатоплановим науковим дослідженням, має типову структуру, виконана у класичній формі. Робота викладена на 314 сторінках друкованого тексту і складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали і методи дослідження», 4 розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, додатку, списку використаних джерел, який налічує 378 посилань (131 – кирилицею, 247 – іноземних авторів). Роботу проілюстровано 22 таблицями, 108 рисунками.

У вступі автор розкриває актуальність дослідження, наукову новизну і практичну значимість, визначає мету та завдання роботи.

В аналітичному огляді літератури наведено сучасні питання патогенезу, діагностики та лікування еректильної дисфункції, медико-соціальне значення дефіциту тестостерону, патогенетичне лікування та перспективи регенераційної медицини в лікуванні андрогенного дефіциту.

У розділі 2 «*Матеріали і методи дослідження*» здобувачем представлений матеріал експериментальних та клінічних досліджень, описані застосовані клінічні, клініко-лабораторні методи дослідження. Ретельно описані методика відтворення експериментальної моделі андрогенного дефіциту та методика отримання культури стромы кісткового мозку з подальшою трансплантацією. Отримані дані було опрацьовано сучасними

статистичними методами, що доводить їх достовірність.

Три розділи власних досліджень послідовно і логічно висвітлюють отримані дані по кожному із завдань та відповідають структурі дизайну роботи.

Розділ 3 *«Розробка експериментальної моделі стійкого вторинного андрогенного дефіциту»* складається з п'яти підрозділів.

Дисертантом вивчалась загальнотоксична дія хлориду кадмію на експериментальних тварин, динаміка показників гормонального статусу, зміни морфоструктури статевих органів при моделюванні гіпогонадізму, вплив хлориду кадмія на копулятивну поведінку тварин.

Дисертантом було встановлено, що введення $CdCl_2$ у дозі 150 мкг/100 г ваги тварини призводило до стійкого андрогенного дефіциту починаючи з 7-ї доби та до 28-ї доби експерименту з відповідними змінами гормонального статусу та копулятивної поведінки експериментальних тварин. При цьому після введення цієї дози летальних випадків не було, а ознаки загальнотоксичної дії на 28-у добу зникали. Це дає підставу стверджувати, що оптимальною дозою $CdCl_2$ для моделювання копулятивної дисфункції на тлі стійкого андрогенного дефіциту є саме 150 мкг/100 г ваги тварин.

У розділі 4 *«Експериментальне обґрунтування лікування андрогенного дефіциту за допомогою клітин строми кісткового мозку»* представлені зміни, які відбуваються в організмі тварин після трансплантації клітин строми кісткового мозку, а саме динаміка показників гормонального статусу та морфологічні зміни статевих органів. Представлені віддалені результати інтратестикулярної трансплантації клітин строми кісткового мозку експериментальним тваринам.

Автором, за результатами серії експерименту з вивчення лікувального впливу інтратестикулярного введення КСКМ тваринам з експериментальним андрогенним дефіцитом (ЕАД) (після введення $CdCl_2$ у дозі 150 мкг/100 г ваги тварини) встановлено, що оптимальною є методика введення 200 тис. КСКМ у кожне яєчко. Такий метод на 28-у добу експерименту призводить до нормалізації рівня статевих гормонів та до покращення структурно-

морфологічних характеристик статевих органів. При цьому спостерігається покращення показників, що характеризують загально-токсичну дію CdCl_2 , що свідчить про позитивний локальний та системний ефект застосування КСКМ. На цьому фоні відмічено значне поліпшення показників копулятивної поведінки експериментальних тварин.

Долідження розподілу трансплантованих КСКМ за допомогою флюоресцентного трекінга дозволило підтвердити, що одразу після інокуляції КСКМ знаходяться у вигляді глибок вздовж довгої осі яєчка, а через добу після введення вже рівномірно розподіляються по зрізу яєчка та зберігаються у міжканальцевому просторі на 14 та на 28 добу експерименту. Це свідчить про збереження клітин та їх функціональну активність.

Гістологічні дослідження статевих органів у віддаленому періоді після введення КСКМ дозволили виявити незворотні тривалі позитивні зміни при відсутності ознак злякисних новоутворень.

Отримані дані свідчать про перспективу застосування КСКМ з метою лікування андрогенного дефіциту та еректильної дисфункції у чоловіків, що стало підставою для проведення клінічного дослідження.

У розділі 5 *«Застосування клітин стромы кісткового мозку для лікування андрогенного дефіциту у чоловіків з цукровим діабетом»* автором представлені клінічна апробація впливу клітин стромы кісткового мозку у хворих з еректильною дисфункцією та тлі андрогенного дефіциту та надлишкової маси тіла.

Дисертантом було встановлено, що інтратестикулярне введення КСКМ сприяє відновленню концентрації тестостерону у досліджуваних хворих вже на 4-му тижні лікування зі збереженням позитивного впливу до 12-го тижня з незначним зменшенням ефекту через 24 тижні. Цей ефект майже не відрізняється від ГЗТ тестостероном ундеконатом. Однак традиційна ГЗТ тестостероном потребує повторних ін'єкцій кожні 10–12 тижнів, її застосування обмежено у чоловіків, які бажають зберегти фертильність.

Крім відновлення рівня тестостерону, спостерігається тенденція до нормалізації ваги, ІМТ, показників вуглеводного та жирового обмінів. Це відбувається одночасно з покращенням клінічної картини – зменшенням виразності ЕД. Ці ефекти пояснюються не тільки відновленням тестостерону, але й дотриманням пацієнтами рекомендованих заходів щодо зменшення ваги (дієта, дозоване фізичне навантаження та ін.), а також лікування ЦД з досягненням його компенсації.

Яких-небудь негативних ефектів застосування аутологічних КСКМ протягом періоду спостереження не виявлено.

Отримані дані свідчать про перспективність запропонованого методу лікування андрогенного дефіциту, але потрібне подальше накопичення клінічних даних та з'ясування оптимальної кількості клітин, необхідних для досягнення стійкого позитивного ефекту.

Заключний розділ присвячений аналізу та узагальненню результатів. У ньому лаконічно представлено основні отримані результати. Розділ написаний докладно, містить велику кількість фактичного матеріалу, не зважаючи на це сприймається легко і залишає хороше враження.

Висновки дисертаційної роботи сформульовані чітко, логічно випливають з результатів дослідження і відповідають поставленим меті та задачам.

Автореферат в повній мірі розкриває зміст роботи і відображає отримані в ній результати.

Робота написана гарною українською мовою, виділяється професійний стиль. В цілому справляє добре враження і заслуговує позитивної оцінки.

Таким чином, дисертаційна робота Антоняна І.М. має суттєве теоретичне і практичне значення, її матеріали можуть зайняти належне місце в лекційних курсах з урології для студентів медичних ВУЗів, лікарів-інтернів та курсах тематичного удосконалення лікарів.

Зауваження до змісту дисертаційної роботи. При оцінці змісту та оформлення дисертації зустрічаються поодинокі пунктуаційні помилки та русизми, окремі речення мають складну граматичну структуру, що утруднює сприйняття роботи не впливаючи на її загальну інформативність. Однак слід підкреслити, що матеріал досліджень, заключна частина, висновки викладені послідовно і логічно, простежується широка літературна обізнаність та наукова ерудиція автора, тому принципових зауважень немає.

В ході ознайомлення з дисертаційною роботою виникли запитання, що носять дискусійний характер:

1. Поясніть, будь ласка, відмінність Вашого експерименту вивчення трекінгу КСКМ, що помічені GFP? Чи можливо проведення такого експеримента із соматичними клітинами замість КСКМ?
2. Відомий негативний вплив тестостерон-замісної терапії на якість спермограми. Чи досліджували Ви вплив КСКМ на зміни спермограми?

Висновок. Дисертаційна робота Антоняна Ігоря Михайловича на тему «Застосування клітин строми кісткового мозку для лікування еректильної дисфункції на тлі андрогенного дефіциту (експериментально-клінічне дослідження)» є закінченим самостійним науковим дослідженням, у якому міститься нове вирішення актуальної проблеми урології - поліпшення ефективності лікування еректильної дисфункції на тлі дефіциту тестостерону у хворих з цукровим діабетом та надлишковою масою тіла шляхом експериментальної розробки та клінічної апробації методу клітинної терапії із застосуванням клітин строми кісткового мозку, методологією дослідження, ґрунтовністю аналізу та інтерпретацією отриманих даних, повнотою викладення принципових наукових положень, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням отриманих результатів, змістом, обсягом та оформленням дисертація повністю відповідає вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановами

Кабінету Міністрів України №567 від 24. 07. 2013 р. та №656 від 19.08.15 р., що пред'являються до докторських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.01.06 «урологія».

Офіційний опонент

Завідувач кафедри урології

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України».

д. мед. н., професор


В.П.Стусь

Підпис
ЗАСВІДЧУЮ
ДЗ «ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА
АКАДЕМІЯ МОЗ УКРАЇНИ»
20__р.


Генеральний секретар,
д. мед. н. Ожук Н.М.