

ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертацію та автореферат

КОВПАКА ВІТАЛІЯ ВАСИЛЬОВИЧА

на тему „ *Порівняльна характеристика стовбурових клітин та ефективність їх застосування за експериментального цукрового діабету у тварин* ” поданої на захист у спеціалізовану вчену раду Д 26.004.03 при Національному університеті біоресурсів та природокористування України на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.02 – патологія, онкологія і морфологія тварин

Актуальність обраної теми. Розкриття потенційних можливостей стовбурових клітин відкрило нові можливості клітинної терапії у гуманній та ветеринарній медицині. Пізнання особливостей стовбурових клітин мають не тільки загальнобіологічне значення, а й конкретне практичне значення для розвитку потужного напрямку в сучасній ветеринарній медицині, а саме: клітинної заміщуючої терапії при багатьох, часто невиліковних патологічних процесах в органах і тканинах. Перспективи успішного використання у ветеринарній медицині клітинно-регенеративної терапії у значній мірі залежать від результатів ґрунтовного вивчення властивостей стовбурових клітин тварин, способів їх отримання, культивування, зберігання та застосування з лікувальною метою.

Вивчення шляхів регенерації підшлункової залози досі не повністю з'ясовано, тому лікування хворих на цукровий діабет з використання культури клітин отриманої з підшлункової залози є особливо актуальним напрямком. Більшість науковців схиляється до думки, що основну регенераційну функцію у підшлунковій залозі виконує епітелій проток, клітини якого, як вважають, є «факультативними стовбуровими клітинами». Існує припущення, що β -клітини також здатні до поділу. Тому дослідження властивостей стовбурових клітин тварин за експериментального інсулінозалежного цукрового діабету є досить актуальними та сприятимуть розробці науково обґрунтованих і ефективних методів клітинної терапії у вітчизняній ветеринарній медицині

Дисертація є частиною наукових тем Національного університету біоресурсів і природокористування України «Вивчення морфофункціональних характеристик патологічно змінених тканин у тварин-реципієнтів при застосуванні стовбурових клітин» (номер державної реєстрації 0111U003428, 2011–2015 рр.); «Дослідити особливості коригуючої дії введених стовбурових клітин на патологічно змінені структури і функції тканин в організмі тварин-реципієнтів» (номер державної реєстрації 0115U003476, 2015–2017 рр.).

Виходячи із напрямків досліджень, визначених у державних завданнях, автор дисертаційної роботи поставив за мету дослідити

біологічні властивості стовбурових клітин різного походження та ефективність їх застосування за експериментального інсулінозалежного цукрового діабету у тварин. Усе це підтверджує актуальність обраної теми, вказує на її новизну, визначає науково-методичний рівень і практичну значимість таких досліджень. Тому можна вважати, що тема дисертації Ковпака Віталія Васильовича є актуальною, а отримані результати досліджень мають важливе теоретичне та практичне значення, оскільки вносять вагомий вклад в оптимізацію технології виділення, культивування і впливу стовбурових клітин, отриманих з кісткового мозку, підшлункової залози та жирової тканини, на перебіг експериментально сформованого алоксанового цукрового діабету у щурів та котів. Представлено імунофенотипову та генетичну характеристики вище зазначених стовбурових клітин у процесі їх культивування залежно від видової належності.

Наукова новизна одержаних результатів. Наукова новизна дисертаційної роботи Ковпака В. В. не викликає сумніву. При виконанні дисертаційного дослідження, здобувачем використано комплексний підхід у виборі методів дослідження для забезпечення виконання поставлених завдань, а саме: біотехнологічні (культивування клітин); імуноцитохімічні (імунофенотипової характеристики клітин у культурі); цитогенетичні (аналіз каріотипу клітин); імунологічні (визначення кількості лейкоцитів та їх субпопуляцій, дослідження цитотоксичної активності сироватки та лімфоцитів крові); гістологічні; хірургічні (аспірація червоного кісткового мозку, отримання жирової тканини та підшлункової залози, трансплантація культур клітин під капсулу підшлункової залози); статистичні (опрацювання цифрових показників результатів досліджень).

Наукові положення, які викладені у дисертації впливають з отриманих результатів і ґрунтуються на глибокому аналізі й узагальненні даних літератури. Більшість наукових положень дисертації сформульовані вперше, що свідчить про їх новизну, теоретичне і практичне значення.

Наукова новизна положень, які сформульовані у дисертації, полягає в наступному:

Вперше проведено порівняльний аналіз біологічної активності стовбурових клітин культур, отриманих з червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози kota. Розроблено технології виділення та умов культивування *in vitro* стовбурових клітин щура та kota з червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози.

На основі імуноцитохімічних досліджень встановлено відмінності у експресії маркерів між клітинами культур червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози, а також зміну ступеня їх прояву у процесі культивування.

Вперше проведено порівняльний аналіз генетичної стабільності стовбурових клітин культур, отриманих з різних джерел (червоний кістковий мозок, жирова тканина, підшлункова залоза), від kota та щура у процесі культивування *in vitro*.

Доведено позитивний вплив трансплантації клітин культур на відновлення фізіологічних показників за експериментального інсулінозалежного цукрового діабету у тварин.

Наукова новизна отриманих результатів підтверджена патентами на корисні моделі: № 102631 від 10.11.2015 р. «Спосіб отримання епітеліальних клітин підшлункової залози»; № 118933 від 28.08.2017 р. «Спосіб отримання культури клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини котів».

Практичне значення одержаних результатів. Отримані, проаналізовані та узагальнені дисертантом результати досліджень, представляють теоретичний інтерес і мають практичну значимість. Дисертантом проведено дослідження з трансплантації культур стовбурових клітин та виявлено нові ланки патогенезу цукрового діабету, які визначили нові можливості корекції інсулінової недостатності за рахунок стимулювання проліферації клітин, що синтезують інсулін, а також прогеніторних клітин підшлункової залози з їх трансформацією у β -клітини. Різна активність відновлювальних процесів за трансплантації культур стовбурових клітин підшлункової залози, кісткового мозку та жирової тканини дає можливість вибору найбільш раціонального напрямку терапії тварин, хворих на цукровий діабет.

Результати оцінки каріотипової та цитогенетичної стабільності стовбурових клітин у культурі залежно від тривалості культивування *in vitro* мають важливе значення в оцінці їх безпечності. Отримані результати можуть бути використані у наукових дослідженнях властивостей стовбурових клітин тваринного організму та для надання методичних рекомендацій практикуючим ветеринарним лікарям.

Крім того, отримані дані мають певну навчально-прикладну значимість. Результати отриманих досліджень використані при написанні монографії: «Стовбурові клітини у ветеринарній медицині» і навчального посібника «Клітинні технології у ветеринарній медицині». Результати досліджень увійшли до науково-методичних рекомендацій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота Ковпака В. В. викладена на 360 сторінках і складається з анотації, переліку умовних позначень, вступу, 4 розділів, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел і додатків. Дисертація викладена на 360 сторінках комп'ютерного тексту. Матеріали дисертації проілюстровано 94 рисунками і 31 таблицею. Список використаних джерел налічує 669 найменувань, з яких 510 латиницею.

На підставі аналізу дисертаційної роботи робимо висновок, що вона містить усі розділи, передбачені вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженою постановою Кабінету Міністрів України щодо її відповідності кваліфікаційної наукової роботи рівня докторської дисертації.

Вступ до дисертації присвячений обґрунтуванню важливості поглиблення і розширення досліджень, скерованих на вирішення питань

культивування, диференціації, консервування та використання стовбурових клітин тваринного організму.

Розділи і підрозділи власних досліджень дисертації викладені у чіткій послідовності, логічно обґрунтовані, пов'язані один з одним, комплексно і конкретно розкривають наукову проблему. Усестороння обізнаність дисертантом проблеми є підставою для того, щоб стверджувати що структура роботи, методичні підходи, проведені експериментальні дослідження та їх подальший аналіз зроблені цілком логічно й обґрунтовано. Як позитив слід відзначити аналітичний підсумок у кожному підрозділі.

Розділ 1. “Огляд літератури” інформативний, відповідає меті дослідження, написаний на високому науковому рівні і викладений на 53 сторінках дисертації. Автор відзначає, що незважаючи на певні досягнення сучасної діабетології, проблеми забезпечення стабільності перебігу цукрового діабету і боротьби із вторинними ускладненнями цього розповсюдженого захворювання, як і раніше, залишаються актуальними. Сучасна інсулінотерапія й інші консервативні методи лікування тварин з цукровим діабетом дозволяють контролювати ранні ускладнення даного захворювання (гострий кетоацидоз, гіперосмолярну кому й ін.), однак це не запобігає розвитку і прогресуванню пізніх ускладнень (нефропатія, ретинопатія, ангіопатія тощо). Заміщуюча клітинна терапія на сьогодні вважається найбільш перспективним методом боротьби з даною патологією.

Разом з тим, залишається відкритим питання щодо порівняння терапевтичної ефективності за трансплантації клітин різного походження у розрізі даної патології.

Оскільки ефективна трансплантація потребує достатньої кількості клітинного матеріалу, отримати яку можливо лише шляхом культивування *in vitro*, постає ряд запитань щодо поведінки клітин у культурі, їх фенотипової та генетичної стабільності, а також імунної відповіді організму на введення клітинного матеріалу.

У зв'язку з цим існує необхідність проведення досліджень щодо порівняння біологічних властивостей культур клітин різного походження та вивчення їх впливу за трансплантації за експериментального цукрового діабету тварин.

Ковпак В. В. добре володіє матеріалом про стан даної проблеми, вміє об'єктивно оцінювати літературні дані з різних аспектів проблематики, чітко бачить ціль і завдання роботи. Саме тому ця наукова робота є на часі. Підсумовуючи розглянутий огляд літератури слід виділити, що він написаний професійно, грамотно й логічно, із аналізом результатів багатьох дослідників, які вивчали саме ці питання. Список літератури викладений у алфавітному порядку.

Розділ 2. «Результати власних досліджень». «Вибір напрямків досліджень, матеріали та методи досліджень». У даному розділі (дисертація ст. 85–123) дотримуючись методичної та логічної послідовності, дисертант провів дослідження на базі Проблемної науково-дослідної

лабораторії фізіології та експериментальної патології тварин кафедри фізіології, патофізіології та імунології тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України. Окремі елементи досліджень проводилися у лабораторії біотехнології медичного центру ТОВ «Biotexcom».

У дослідах використано клінічно здорових тварин: 80 самців білих нелінійних щурів масою тіла 200–250 г, віком 4–5 місяців; білих нелінійних щуренят 12-добового віку; 4 самці і 4 самиці безпородних котів віком 15–17 місяців; завмерлих плодів кошенят, що залишилися після надання рододопомоги.

На **I етапі** проведено дослідження проліферативної активності стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура та kota за культивування у різних за складом культуральних середовищах.

II етап досліджень полягав у вивченні організму тварин-реципієнтів за впливу трансплантованих культур стовбурових клітин та здатності клітин мігрувати у підшлункову залозу за різних шляхів введення.

III етап досліджень проводився на котах, орієнтуючись на результати, отримані під час виконання II-го етапу досліджень на щурах. Він полягав у вивченні впливу трансплантованих культур стовбурових клітин на перебіг алоксанового цукрового діабету у котів шляхом моніторингу рівня глюкози. Трансплантацію здійснювали на 20-ту, 30-ту, 40-ву та 50-ту доби від початку моделювання цукрового діабету.

Методичні підходи та методики, що використовувались, є сучасними та дають можливість для глибокого розкриття питань дисертаційної роботи і отримати об'єктивний науковий матеріал.

Розділ 3. «Результати досліджень» (дисертація ст. 124–215) містить 16 підрозділів.

озділ 3.1. «Проліферативна активність стовбурових клітин кісткового мозку щурів та котів у культурі залежно від складу культурального середовища (дисертація стор. 124–130), містить 3 рисунки та 2 таблиці, що полегшує сприйняття матеріалу. Проведене дисертантом порівняльне дослідження трьох культуральних середовищ показало, що достовірно найвищий індекс проліферації за культивування стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку щура відбувається в середовищі Ігла, модифікованого Дюльбеко F12 (D8437), а kota – у культуральному середовищі яке містило у своєму складі DMEM (D5648)

Підрозділ 3.2 «Ефективність заморожування стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку залежно від методу заморожування та складу кріосередовищ» (дисертація ст. 130–138, містить 4 рисунки і 4 таблиці). У цьому підрозділі здобувач висвітлює, що кріоконсервування культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура шляхом повільного заморожування у кріосередовищі, що складається з 90 % фетальної бичачої сироватки (FBS) та 10 % диметилсульфоксиду (ДМСО), дозволяє зберегти життєздатність клітин у межах $86,3 \pm 1,3$ %, у той час як для kota найефективнішим є

кріосередовище, яке складається з 95 % FBS та 5 % ДМСО, життєздатних клітин – $65,7 \pm 0,9$ %.

Аналіз каріотипу стовбурових клітин кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози показав, що як за кріоконсервування, так і без них характерні кількісні порушення (анеуплоїдія та поліплоїдія). Автором також було виявлено, що стовбурові клітини, що піддавались кріоконсервуванню, рівень хромосомних порушень був вищий, ніж у контролі (без кріоконсервування).

Підрозділ 3.3. «Виділення стовбурових клітин з жирової тканини щура та kota для отримання культури» (дисертація ст. 138–144, містить 3 рисунки, 2 таблиці). Проведені дисертантом дослідження показали, що найбільш ефективним методом дезагрегації жирової тканини щура з метою отримання культури стовбурових клітин є використання: 2 мг/мл колагенази типу II та додавання 4 % бичачого сироваткового альбуміну, а у kota: 1 мг/мл колагенази, 5 мг/мл гіалуронідази та 4 % бичачого сироваткового альбуміну.

Підрозділ 3.4. «Виділення стовбурових клітин з підшлункової залози щура для отримання культури» (дисертація ст. 144–146, містить 1 рисунок, 1 таблицю). Автор виявив низьку ефективність використання ензимів при отриманні культур стовбурових клітин підшлункової залози щура, яка ймовірно обумовлена руйнуванням ацинарних клітин та вивільненням їх ферментів, що зумовлює загибель значної кількості стовбурових клітин. Використання методу експланту для отримання культури стовбурових клітин підшлункової залози у щурів дозволяє отримати достовірно більшу кількість стовбурових клітин порівняно з ферментативною дезагрегацією.

Підрозділ 3.5. «Морфологія культур стовбурових клітин щура, отриманих з різних джерел у процесі культивування» (дисертація ст. 146–152, містить 5 рисунків). Дисертант відзначає, що культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози характеризуються морфологічною гетерогенністю з переважанням клітин фібробластоподібної форми, проте з IV-го пасажу культури візуально стають гомогенними. У процесі субкультивування час досягнення конфлюентності КСКПЗ 70–80 % становить 4 доби, КСКЧКМ – 3 доби, КСКЖТ – 4 доби. Первинна КСКЧКМ, КСКЖТ, КСКПЗ досягає конфлюентності 90–100 % у середньому за 8, 14 і 14 діб відповідно.

Підрозділ 3.6. «Зміни морфології культур стовбурових клітин kota, отриманих з різних джерел у процесі культивування» (дисертація ст. 153–156, містить 3 рисунки). Здобувачем встановлено, що найбільш гомогенний склад культури на п'ятому пасажі. Їх морфологічна картина характеризувалась переважанням фібробластоподібних клітин. У процесі субкультивування час досягнення конфлюентності КСКЧКМ – 70–80 % становить 3 доби, КСКЖК – 4 доби, КСКПЗ – 4 доби.

Підрозділ 3.7. «Імунофенотипова характеристика культур клітин щура *in vitro*» (дисертація ст. 156–161, містить 3 таблиці, 1 рисунок). У

культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура упродовж всього часу дослідження експресії CD10 та CD54 не спостерігалось. Відмічалось зниження рівня прояву CD34 від помірного до низького. Експресія CD38 знизилася різко з помірного рівня (I пасаж) до її відсутності (IV пасаж).

Імунофенотипування культури клітин, культури стовбурових клітин, отриманих з жирової тканини, дозволило прослідкувати зміни, які відбуваються у ній під час культивування. Так, на всіх пасажах CD10, CD54 та CD56 мали негативний ступінь експресії. Експресія CD34, CD38, CD45 та CD48 знижувалася від низького до негативного рівня, відзначали зворотну залежність експресії CD227 та CD326, оскільки рівень експресії з кожним пасажем зростав.

Клітини культури підшлункової залози щура експресують найменший спектр досліджуваних CD-маркерів, проте експресія епітеліальних маркерів добре виражена.

Підрозділ 3.8. «Імунофенотипова характеристика культур клітин kota *in vitro*» (дисертація ст. 161–167, містить 3 таблиці, 1 рисунок). Дисертантом встановлено, що культура клітин червоного кісткового мозку kota містить у своєму складі гемопоетичні клітини (як стовбурові, так і ні), мезенхімальні стовбурові клітини, та, можливо, епітеліальні. Оскільки показники CD-маркерів, характерних для епітеліальних клітин, дуже різняться за своєю експресією, можна припустити, що роль даних кластерів диференціювання у червоному кістковому мозку та його культурах вивчена не достатньо. У культурі клітин жирової тканини kota, починаючи з III пасажу, збільшується експресія маркерів, що характеризують спрямовану диференціацію клітин в адипогенному напрямку

У культурі клітин підшлункової залози спостерігали клітини з найменшим спектром експресії використаних CD-маркерів. Автор вважає, що початок культури в основній масі дали клітини дрібних проток, які в процесі культивування піддавалися дидиференціації

Отримані дисертантом дані за час імунофенотипування стовбурових культур клітин, показав, що вони неоднорідні за своєю морфологією та додатково змінюються з пасажами. Підібрана панель CD-маркерів характерна для слабодиференційованих (прогеніторних, стовбурових) клітин.

Підрозділ 3.9. «Цитогенетичний аналіз стовбурових клітин щура, отриманих з різних джерел, у процесі культивування» (дисертація ст. 167–178, містить 6 таблиць, 3 рисунки). Дисертантом у процесі культивування клітин виділених з червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози щурів виявлено кількісні хромосомні порушення (генетичні зміни) у вигляді анеуплоїдій та поліплоїдій. Мінливість каріотипу досліджуваних культур у процесі культивування не виходила за межі спонтанного рівня мутагенезу, характерного для ссавців.

Підрозділ 3.10. «Цитогенетичний аналіз стовбурових клітин kota, отриманий з різних джерел, у процесі культивування» (дисертація

ст. 178–182, містить 1 рисунок і 3 таблиці). Дисертант у процесі культивування виявляв метафазні пластинки хромосом з анеуплоїдією у КСКЧКМ з I до V пасажа. Найнижчий їх відсоток ($9,3 \pm 0,8$ %) спостерігали на I пасажі, який поступово зростав до III пасажу.

Метафазні пластинки з анеуплоїдним набором хромосом у КСКЖТ та КСКПЗ автор виявляв з I до V пасажу, де найнижчий їх відсоток спостерігав на I пасажі, а максимальний відсоток клітин з некратним набором хромосом (анеуплоїдією) – на V пасажі

Підрозділ 3.11. «Мікроскопічні зміни в різних органах щурів за алоксанового цукрового діабету» (дисертація ст. 182–193, містить 10 рисунків). Дисертантом у даному підрозділі представлені мікроструктурні зміни в підшлунковій залозі, печінці, нирках та серці щурів за алоксанового цукрового діабету.

Підрозділ 3.12. «Міграційна здатність стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку в зону пошкодження» (дисертація ст. 193–195, містить 1 рисунок). Автор відзначає, що за місцевого введення культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку тваринам з експериментально сформованим цукровим діабетом на 8-му добу спостерігали їх дифузне розміщення у тканині підшлункової залози. За внутрішньовенної трансплантації клітин, мічених Hoechst, виявляли поодинокі сигнали, що свідчить про їх незначну міграцію до пошкодженого органу, а також про те, що основна маса клітинного матеріалу так і не досягла підшлункової залози.

Підрозділ 3.13. «Імунна відповідь організму тварин-реципієнтів на введення стовбурових клітин» (дисертація ст. 195–206, містить 2 рисунки, 5 таблиць).

Автор вказує, що сироватка крові сенсibilізованих щурів на 7-у добу після внутрішньовенної трансплантації стовбурових клітин культури підшлункової залози проявляє цитотоксичний ефект щодо останніх *in vitro*. Цитотоксичність сироватки на культуру стовбурових клітин підшлункової залози із її наступним зниженням із пасажами дисертант пояснює наявністю у первинній культурі диференційованих клітин, кількість яких із пасажами знижується.

Підрозділ 3.14. «Зміна рівня глюкози у крові за алоксанового цукрового діабету за трансплантації стовбурових клітин культур, отриманих з різних джерел» (дисертація ст. 207–209, містить 1 рисунок).

На основі отриманих даних дисертант стверджує, що на 20-ту добу після формування алоксанового цукрового діабету, окремі тканини дослідних тварин не здатні нормально транспортувати глюкозу з крові внаслідок нестачі інсуліну.

На 20-ту добу після формування цукрового діабету дослідним щурам проводили трансплантацію культур клітин під капсулу підшлункової залози: тваринам I групи – КСКЧКМ, II – КСКПЗ, III – КСКЖТ. Трансплантація культур стовбурових клітин підшлункової залози, жирової тканини та червоного кісткового мозку за експериментального цукрового

діабету сприяла достовірному зниженню рівня глюкози у крові тварин-реципієнтів.

Підрозділ 3.15. *«Мікроскопічна будова підшлункової залози щурів за експериментального цукрового діабету за введення стовбурових клітин культур отриманих з різних джерел»* (дисертація ст. 209–213, містить 2 рисунки). В цьому підрозділі автором за гістологічного дослідження тканин підшлункової залози тварин, яким вводили культуру стовбурових клітин підшлункової залози, встановлено зростання середньої кількості острівців на одиницю площі порівняно із тваринами контрольної групи. Дисертант стверджує, що введення культур стовбурових клітин підшлункової залози, червоного кісткового мозку та жирової тканини під капсулу підшлункової залози щурів на фоні алоксанового цукрового діабету сприяє достовірному збільшенню кількості клітин острівців Лангерганса

Підрозділ 3.16. *«Дослідження впливу стовбурових клітин культури підшлункової залози на перебіг експериментально сформованого цукрового діабету у котів»* (дисертація ст. 213–215, містить 1 рисунок, 1 таблицю). Дисертантом встановлено, що за трансплантації культури клітин підшлункової залози у крові дослідних котів відбувалось поступове зниження рівня глюкози.

На загал потрібно відзначити, що у дисертації добре побудована база власних досліджень за кількістю підібраних методів досліджень та проаналізованих результатів.

РОЗДІЛ 4. *«Аналіз і узагальнення результатів дослідження»* (дисертація ст. 216–283). Дисертант представив логічно побудований, глибокий та всебічний аналіз і обговорення отриманих результатів. У цьому розділі узагальнено отримані дані, їх співставлено із наявними даними літератури та акцентовано увагу на тому, що нового в дану проблему вніс дисертант. Автор аргументовано порівнює одержані результати досліджень із даними світової наукової літератури. Слід наголосити на тому, що дисертант дає їм глибоке наукове пояснення. В цілому цей розділ викладено професійно, грамотно і характеризує здобувача дисертації як всебічно підготовленого й ерудованого науковця.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертація Ковпака В. В. є завершеною науковою працею, написаною відповідно до поставленої мети. Проаналізувавши в цілому, необхідно відзначити, що дисертація виконана методично правильно, отримані результати викладені послідовно і логічно. Результати досліджень опрацьовані, узагальнені та детально проаналізовані й підтверджені якісними мікро-, цитофотографіями. Отримані результати мають вагомe значення для науки і практики. Все наведене вище дає підстави вважати, що викладені в дисертаційній роботі Ковпака В. В. результати досліджень виконані на належному методичному рівні, що дозволяє робити на їх основі науково обґрунтовані і принципово нові висновки і рекомендації.

Таблиці, рисунки, діаграми у дисертації виконані якісно, вони належно документовані і доповнюють текстовий матеріал.

Загальні висновки (всього 15) повністю впливають із результатів власних досліджень і дозволяють всесторонньо оцінити проведену комплексну роботу. На основі висновків дисертантом сформульовано пропозиції виробництву.

Відповідність змісту автореферату основним положенням дисертації. Зміст автореферату ідентичний дисертації й у достатньому обсязі відображає основні положення дисертаційної роботи. Дисертація та автореферат належним чином оформлені, написані державною мовою у доступній формі. Наукові положення, висновки й пропозиції дисертації та автореферату ідентичні.

Зауваження щодо змісту та оформлення дисертації. Дисертаційна робота Ковпака В. В. має важливе наукове й практичне значення. Оцінюючи практичну цінність даної роботи, вважаємо, що дисертант при проведенні експериментально-теоретичних досліджень вирішив науково-практичну задачу, оскільки вніс значний вклад у вивчення біологічних властивостей стовбурових клітин тварин, провівши біотехнологічні, імуноцитохімічні, цитогенетичні, імунологічні, гістологічні дослідження.

Необхідно зазначити, що поряд із аргументованими беззаперечними положеннями, трапляються твердження, які потребують додаткового уточнення при захисті дисертації.

Оцінюючи дисертаційну роботу Ковпака В.В. в цілому позитивно, необхідно вказати на окремі недоліки та упущення, відзначені при рецензуванні:

– у розділі «Вибір напрямків досліджень, матеріали та методи виконання» описуєте метод фарбування гістологічних зрізів за Ван Гізон, однак в самій роботі не представлена ні одна мікрофотографія, забарвлена за цим методом.

– підрозділи 3.5 і 3.6, які представлені в дисертаційній роботі, не висвітлені в авторефераті.

– на сторінці 171 повтори двох попередніх абзаців

– на ст. 184, під рис. 3.27 у підписах вказуєте під пунктом 4 – вивідна протока. Дозвольте з Вами не погодитись, оскільки на мікрофотографії під цим номером представлений поперечний розріз стінки кровоносних судин;

– на ст. 188, описуючи зміни в печінці щурів за алоксанового цукрового діабету, вказуєте на розвиток запального процесу в органі, але не конкретизуєте саме яке запалення розвивається в печінці;

– на ст. 190–191, описуючи зміни в нирках, ви підтверджуєте ці процеси мікрофотографіями. Слід зауважити, що на мікрофотографіях добре видно різке розширення просвіту звивистих каналців нирок за алоксанового цукрового діабету щурів, а в тексті Ви про це не згадуєте. Поясніть будь ласка чим зумовлений цей процес у нирках?

Трапляються окремі синтаксично-орфографічні помилки, невдалий переклад деяких слів на українську мову.

Публікації основних результатів дисертації Основні матеріали дисертації опубліковані у 30 наукових працях, з яких монографія, 10 статей у наукових фахових виданнях України, 12 статей у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 2 статті у наукових виданнях інших держав, 2 статті у наукових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 2 патенти на корисну модель, методичні рекомендації.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам Все вище викладене дає підстави стверджувати, що незважаючи на зауваження, дисертаційна робота Ковпака В.В. заслуговує позитивної оцінки. Дисертаційна робота є завершеною науковою працею з логічно і послідовно викладеним матеріалом згідно з поставленими задачами, у якій на належному науковому рівні проведено порівняльний аналіз біологічної активності стовбурових клітин культур, отриманих з червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози kota. Розроблено технології виділення та умов культивування *in vitro* стовбурових клітин щура та kota з червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози.

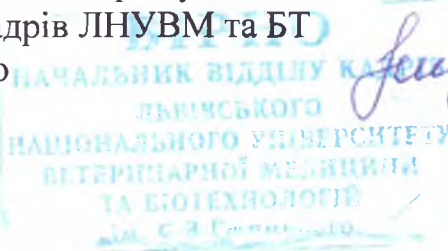
Обґрунтовано, узагальнено результати та доведено позитивний вплив трансплантації культур стовбурових клітин на відновлення фізіологічних показників за експериментального інсулінозалежного цукрового діабету у тварин.

Проаналізувавши дисертаційну роботу і автореферат, вважаю, що за актуальністю, новизною, обґрунтованістю одержаних результатів і положень, практичною значимістю дисертаційна робота Ковпак В.В. **„Порівняльна характеристика стовбурових клітин та ефективність їх застосування за експериментального цукрового діабету у тварин”** відповідають вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів» щодо докторських дисертацій, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013р. № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин»

Офіційний опонент, доктор ветеринарних наук,
зав. кафедри нормальної і патологічної анатомії
та судової ветеринарії Львівського національного
університету ветеринарної медицини та
біотехнологій ім. С.З.Гжицького

Г. І. Коцюмбас

Підпис Коцюмбас Г. І. затверджую.
Начальник відділу кадрів ЛНУВМ та БТ
імені С.З. Гжицького



А. А. Ковтун