

## ВІДЗИВ

офіційного опонента професора Клествої Зінаїди Сергіївни  
на дисертацію та автореферат  
**КОВПАК ОКСАНИ СЕРГІЇВНИ**

на тему: „*Біологічні властивості стовбурових клітин та їх вплив на відновлення міокарда тварин за експериментального ішемічного інфаркту*” поданої на захист у спеціалізовану вчену раду Д 26.004.03 при Національному університеті біоресурсів та природокористування України на здобуття наукового ступеня кандидата 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. Зважаючи на те, що серце у дорослих ссавців має дуже обмежену здатність до регенерації і втрачені клітини замінюються фіброзним рубцем виникає необхідність пошуку методів лікування, що спрямовані відновлювати структури серцевого м'язу після ішемії. Клітинні технології є перспективним методом лікування тварин з інфарктом міокарда, що дозволяє відновлювати його структуру та скоротливу функцію.

Однак, впровадження клітинних технологій у клінічну практику вимагає більш детального викладу протоколів отримання стовбурових клітин, їх культивування та застосування, поглибленого вивчення взаємодії організму-реципієнта із трансплантованими клітинами, ретельного контролю фенотипових і генетичних змін у них для забезпечення високої якості та безпечності застосовуваного клітинного матеріалу у відновлювальній клітинній терапії післяінфарктних змін у міокарді.

Тому дослідження властивостей стовбурових клітин тварин за експериментального ішемічного інфаркту є досить актуальними та сприятимуть розробці науково обґрунтованих і ефективних методів клітинної терапії у вітчизняній ветеринарній медицині.

Дисертацію виконано на базі науково-навчальної лабораторії «Центр клітинних технологій у ветеринарній медицині» Національного університету біоресурсів і природокористування України як підрозділ наукової тематики за темами: «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 отриманих з різних джерел у процесі культивування, та теоретично обґрунтувати й експериментально підтвердити ефективність методу клітинної регенеративної терапії із застосуванням стовбурових клітин, отриманих з різних джерел, на активність відновлення структури міокарда щура, пошкодженого внаслідок експериментального ішемічного інфаркту. 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 Ковпак Оксани Сергіївни є актуальною адже дисертантом описані показники біологічної активності стовбурових клітин тварин (щура, kota) у культурі залежно від джерел їх отримання, методів виділення і культивування; показники функціональних змін у міокарді щура з експериментально сформованим інфарктом після трансплантації стовбурових клітин, отриманих із різних джерел.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Наукова новизна дисертаційної роботи Ковпак О. С. не викликає сумніву, а використання комплексних методів дослідження: біотехнологічні (культивування клітин); імуноцитохімічні (дослідження імунофенотипової характеристики клітин у культурі); цитогенетичні (аналіз каріотипу клітин); імунологічні (дослідження цитотоксичної активності сироватки та лімфоцитів крові); гістологічні (мікроскопічні дослідження); хірургічні (аспірація червоного кісткового мозку, отримання жирової тканини та серця, трансплантація клітин); статистичні (опрацювання цифрових показників результатів досліджень) є доказом їх достовірності.

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 аналіз біологічної активності стовбурових клітин культур, отриманих із міокарда щура, у процесі культивування в системі *in vitro*. Удосконалено технології виділення та культивування в системі *in vitro* стовбурових клітин kota з червоного кісткового мозку, жирової тканини та міокарда.

Вперше проведено фенотиповий та генетичний аналіз культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку, що піддавалася спрямованій диференціації за впливу 5-азацитину.



Доведено вплив трансплантації стовбурових клітин культур, отриманих із різних джерел, на зменшення площі некротизованої тканини міокарда щура за експериментального інфаркту.

Наукова новизна отриманих результатів підтверджена патентом на корисну модель за № 118933 від 28.08.2017 р. «Спосіб отримання культури клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини котів» та актами впровадження результатів дослідження у клінічну практику.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані, проаналізовані та узагальнені дисертантом результати досліджень, представляють теоретичний інтерес і мають практичну значимість. Дисертантом проведено оцінку каріотипової та цитогенетичної стабільності стовбурових клітин у культурі залежно від тривалості культивування в системі *in vitro*, що має важливе значення для оцінювання їх безпечності. Отримані результати можуть бути використані в подальших наукових дослідженнях властивостей стовбурових клітин тваринного організму та як методичні рекомендації для ветеринарних лікарів-практиків.

Результати експериментальних досліджень можуть бути використані у клінічній ветеринарній практиці для лікування котів з дистрофічними змінами у серці. Варто зазначити, що різна активність відновлювальних процесів за трансплантації стовбурових клітин, отриманих із різних джерел, дає змогу обрати найбільш раціональний напрям терапії хворих тварин.

Запропоновані комбінації ферментів, що дають змогу збільшити вихід стовбурових клітин з жирової тканини і міокарда kota та оптимізовані умови їх культивування з використанням стимуляторів росту, з метою отримання більшої кількості клітинного матеріалу, придатного для трансплантації, за короткий проміжок часу з використанням меншого об'єму первинного матеріалу. Отримані результати можуть бути використані як для подальших наукових досліджень, так і у клінічній практиці у процесі застосування клітинних технологій.

Крім того, отримані дані мають певну навчально-прикладну значимість адже результати досліджень увійшли до науково-методичних рекомендацій: «Методи видоспецифічної оцінки стовбурових клітин та їх застосування у ветеринарній клітинній регенеративній терапії» (*затверджено Вченою радою Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 5 від 27 грудня 2017 р.*).

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертація Ковпак О. С. складається з анотації, вступу, чотирьох розділів, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел і додатків. Загальний обсяг дисертації становить 188 сторінок комп'ютерного тексту. Матеріали дисертації проілюстровано 4 схемами, 50 рисунками і 15 таблицями. Список використаних джерел містить 317 найменувань, з яких 273 латиницею.

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



клітинних технологій: культивування, диференціації та використання стовбурових клітин тваринного організму

Розділи і підрозділи власних досліджень дисертації викладені у чіткій послідовності, пов'язані один з одним, комплексно і конкретно розкривають наукову проблему. Всебічна 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 20 сторінках дисертації.

Дисертант відзначає, що останні досягнення регенеративної клітинної терапії з використанням стовбурових клітин і продуктів клітинних технологій відкривають нові перспективи у лікуванні інфаркту міокарда саме із відновленням його структури та скоротливої функції. Доведена можливість регенерувати міокард, ангіогенез, знизити апоптоз міокардіоцитів і загальмувати кардіальне ремоделювання за допомогою стовбурових клітин отриманих з різних джерел.

Однак найчастіше дослідниками використовуються МСК, у той час як поза увагою залишаються роль та властивості тканинних стовбурових клітин в якості альтернативного джерела клітинного матеріалу для клітинної регенеративної терапії. У зв'язку з цим, існує необхідність поглиблення знань щодо біологічних властивостей культур стовбурових клітин отриманих з різних джерел (міокарда, жирової тканини та червоного кісткового мозку) та їх використання для лікування тварин з інфарктом серця.

Ковпак О. С. 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. «Вибір напрямків досліджень, матеріали та методи досліджень».** У даному розділі (дисертація ст. 47–73) дотримуючись методичної та логічної послідовності, дисертант провів дослідження на базі науково-навчальної лабораторії «Центр клітинних технологій у ветеринарній медицині» Національного університету біоресурсів і природокористування України. Окремі елементи досліджень проводилися у лабораторії біотехнології медичного центру ТОВ «Biotexcom».

У дослідях використовували клінічно здорових тварин (70 самиць білих нелінійних щурів масою тіла 200–250 г, віком 4–5 місяців; 9 білих нелінійних



щуренят 12-денного віку; 8 безпородних кішок віком 10 місяців) та нежиттєздатні кошенята, що залишалися після надання рододопомоги.

**I етап досліджень** включав у себе роботу з культурою стовбурових клітин міокарда (КСКМ) щура. В його основі було дослідження біологічних особливостей КСКМ у процесі культивування

**II етап** дослідження полягав у вивченні здатності стовбурових клітин до міграції у зону пошкодження. Дослідженні направленої диференціації стовбурових клітин червоного кісткового мозку у кардіоміогенному напрямку в системі *in vitro*

**III етап** досліджень полягав у вивченні змін у серці щура за експериментального формування інфаркту міокарда та впливу різних видів культур клітин на його перебіг.

**IV етап** досліджень проводився з використанням тканин kota. На даному етапі проводилося визначення оптимального методу отримання культур стовбурових клітин міокарда та жирової тканини kota. При цьому вивчали вплив фактору росту фіброblastів (FGF-2), інсуліноподібного фактору росту (IGF-1), гормону росту (rhGH) у різних концентраціях та Biolaminin 521 LN на проліферативну активність та генетичну стабільність культур стовбурових клітин кісткового мозку, жирової тканини та міокарда.

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. 74–114) містить 7 підрозділів.

**Розділ 3.1. «Оцінка якості і безпечності культур стовбурових клітин міокарда щура, призначених для трансплантації»** (дисертація ст. 74–81), містить 5 рисунків та 3 таблиці, що полегшує сприйняття матеріалу. Проведена дисертантом оцінка якості і безпечності культур стовбурових клітин міокарда щура, призначених для трансплантації виявила, що первинна культура характеризується гетерогенністю, проте в процесі субкультивування вона за рахунок веретеноподібних клітин набуває гомогенності. Культура, отримана з міокарда щура, була не однорідною і за результатами імунофенотипування та змінювалася з пасажами. При цитогентичному аналізі стовбурових клітин, отриманих із міокарда у процесі культивування в системі *in vitro* у клітинах виявляються зміни каріотипу, які проявляються анеуплоїдією, поліплоїдією, появою клітин з мікроядрами та двоядерних клітин, проте їх кількість не виходила за межі спонтанного мутагенезу, характерного для ссавців.

**Підрозділ 3.2 «Оцінка культури червоного кісткового мозку щура після направленої диференціації у кардіоміогенному напрямку»** (дисертація стор. 82–85, містить 1 рисунок і 2 таблиці). У цьому підрозділі здобувач висвітлює, що після направленої диференціації у кардіоміогенному напрямку шляхом додавання 5-азацитидину виявили появу у ній осередків епітеліоподібних



клітин, які експресують маркери, характерні для кардіоміоцитів (CD10<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD95<sup>+</sup>, CD326<sup>low</sup>, тропонін I<sup>+</sup>). Цитогенетичний аналіз культури, що піддавалася диференціації показав, що у культурі знижується відсотковий вмісту анеуплоїдних та підвищується – поліплоїдних клітин.

*Підрозділ 3.3. «Особливості регенерації в міокарді щура за експериментального інфаркту»* (дисертація ст. 85–93, містить 11 рисунків). Проведені дисертантом дослідження показали, що оптимальним методом формування інфаркту міокарда є лігування висхідної гілки лівої коронарної артерії, що повною мірою дозволяє досягнути змін, характерних для ішемії міокарда з подальшим некрозом. При гістологічному дослідженні зразків серця з сформованим інфарктом міокарда дисертант відмічала стадійність розвитку патологічного процесу та збільшення зони пошкодження, що, можливо, відбувалося за рахунок стискання судин набряклими пошкодженими кардіоміоцитами.

*Підрозділ 3.4. «Цитотоксична активність лімфоцитів і сироватки крові щурів відносно алогенної культури стовбурових клітин міокарда»* (дисертація ст. 93–96, містить 2 рисунки, 1 таблицю). Дисертант виявив, що лейкоцити та сироватка крові сенсibilізованих щурів на 7 добу після інтраперетоніального введення їм стовбурових клітин, отриманих з міокарда щура, проявляють цитотоксичний ефект щодо останніх в системі *in vitro*, автор відмічає, що цитотоксичний вплив як сироватки крові, так і лейкоцитів крові був менший на клітини IV пасажу.

*Підрозділ 3.5. «Здатність стовбурових клітин до міграції у міокард за його ушкодження»* (дисертація ст. 96–98, містить 1 рисунок). Автор довела, що інтраміокардіальне введення стовбурових клітин за експериментального інфаркту міокарда є найбільш оптимальним, на що вказує присутність трансплантованих клітин у каналі введення на 2 добу та їх дифузне розміщення у міокарді на 8 добу після введення.

*Підрозділ 3.6. «Вплив трансплантації стовбурових клітин культур отриманих з різних джерел на активність відновлення структури міокарда щура внаслідок експериментального ішемічного інфаркту»* (дисертація ст. 98–100, містить 1 таблицю). Здобувачем встановлено, позитивний терапевтичний вплив на регенераційний процес в ушкодженій зоні міокарда за експериментального інфаркту у щурів за трансплантації стовбурових культур клітин, отриманих з різних джерел, на це вказує зменшення зони ушкодження міокарда на 25 добу у порівнянні з контролем. Дисертант зазначає, що найефективнішим є застосування стовбурових клітин міокарда, за якого площа некрозу на 7 % менша такого показника у тварин контрольної групи.

*Підрозділ 3.7. «Оптимізація умов отримання і культивування культур стовбурових клітин кота отриманих з різних джерел»* (дисертація ст. 100–114, містить 6 таблиць, 9 рисунків). Здобувачем встановлено, що ферментативна обробка тканин серця кота комбінацією 2,5 % трипсину з додаванням 0,5 мг/см<sup>3</sup> колагенази (тип II) та 0,5 мг/ см<sup>3</sup> гіалуронідази з



експозицією 12 годин за температури 4 °С є оптимальною та дозволяє отримати на 5 добу культивування в 27,6 разів більше клітин, здатних до проліферації, ніж у контрольній групі (метод експланту). У той час як оптимальним методом отримання культури стовбурових клітин жирової тканини є ферментативна обробка комбінацією 1 мг/ см<sup>3</sup> колагенази, 10 мг/ см<sup>3</sup> гіалуронідази з додаванням 4 % бичачого сироваткового альбуміну, що в свою чергу на 10 добу культивування дозволило отримати в 51 раз більше клітин ніж у групі клітин без застосування ферментів (контроль).

Дисертант довела, що стимулятори росту мають суттєвий вплив на проліферативну активність стовбурових клітин у культурі та не призводить до достовірного збільшення кількості клітин зі зміненим каріотипом (у порівнянні з контролем).

**Розділ 4. «Аналіз і узагальнення результатів дослідження»** (дисертація стор. 115–135). Дисертант представила логічно побудований, глибокий та всебічний аналіз і обговорення отриманих результатів. У цьому розділі узагальнено отримані дані, співставлено їх 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 Ковпак О. С. 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 дисертації Ковпак О. С. 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 10) повністю впливають із результатів досліджень Ковпак О.С. 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 Ковпак О. С. має важливе наукове й практичне значення. Оцінюючи практичну цінність даної роботи, вважаємо, що дисертант при проведенні експериментально-теоретичних досліджень вирішила науково-практичну задачу, оскільки внесла значний вклад у вивчення біологічних властивостей стовбурових клітин тварин, провівши біотехнологічні, імуноцитохімічні, цитогенетичні, імунологічні, гістологічні дослідження.

Оцінюючи дисертацію з позитивної сторони, слід відмітити, що її автором проведена значна наукова робота, розроблена логічна програма експериментів, проведено дослідження на високому методичному рівні, одержані цінні наукові результати. Разом з тим, дисертаційна робота Ковпак Оксани Сергіївни має певні недоліки та зауваження, на які необхідно звернути увагу:

1. При написанні дисертації здобувач зазначає достовірність результатів лише у таблицях, у той час як у самому тексті дисертації ці дані не вказує (ст. 77, 78, 99).

2. На сторінці 79 рисунок 3.4. доцільніше було б підписати «Мікрофотографії метафазних пластинок хромосом клітин міокарда щура» замість «Мікрофотографії метафазних пластинок щура».

3. На сторінці 94 речення «Існують суперечливі дані щодо імунологічних властивостей стовбурових клітин: за даними одних авторів вони володіють імуносупресивною дією, у той час як інші автори імунологічні властивості стовбурових клітин пов'язують з їх дозою, способом введення та видом клітинного трансплантату на ...» є незакінченим.

4. У тексті здобувач використовує термін «чашки» доцільніше вживати «культуральний посуд».

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

Додатково хотілося б уточнити деякі питання:

1. Чи використовували Ви додаткові методи підтвердження інфаркту міокарда у щурів, окрім гістологічних (наприклад електрокардіографію, біохімічне дослідження крові)?

2. Чим обумовлений вибір панелі CD-маркерів у Вашому дослідженні?

3. Чим Ви пояснюєте тенденцію до зменшення кількості клітин з поліплоїдним набором хромосом у культурі стовбурових клітин міокарда щура з  $2,2 \pm 1,3$  % на I пасажі до повної її відсутності на VI?

4. Чим ви пояснюєте зниження мітотичного індексу у культурі



стовбурових клітин міокарда щура з пасажами?

5. Чому у своїх дослідженнях Ви використовували саме котів?

6. Яких правових аспектів при роботі з експериментальними тваринами Ви дотримувалися?

7. У дослідженнях з отримання та культивування клітин здобувачем отриманий результат з досить великими числами похибки середнього арифметичного ( $\pm m$ ). Як Ви можете це пояснити?

**Публікації основних результатів дисертації.** За результатами досліджень опубліковано 11 наукових праць, зокрема 3 статті у наукових фахових виданнях України, 4 статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, стаття у науковому виданні іншої держави, стаття в іншому науковому виданні України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, патент на корисну модель, методичні рекомендації.

**Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.** Все вище викладене дає підстави стверджувати, що незважаючи на зауваження, дисертаційна робота Ковпак О. С. заслуговує позитивної оцінки. Дисертаційна робота є завершеною науковою працею з логічно і послідовно викладеним матеріалом згідно з поставленими задачами.

Проаналізувавши дисертаційну роботу і автореферат, вважаю, що за актуальністю, новизною, обґрунтованістю одержаних результатів і положень, практичною значимістю дисертаційна робота Ковпак О. С. *„Біологічні властивості стовбурових клітин та їх вплив на відновлення міокарда тварин за експериментального ішемічного інфаркту”* відповідають “Положенню” ДАК України, які ставляться до кандидатської дисертації. Вважаю, що дисертаційна робота відповідає вимогам п.11 Порядку присудження наукових ступенів щодо кандидатських дисертацій, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013р. № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин».

Офіційний опонент доктор ветеринарних наук,  
заступник директора з наукової роботи  
Державного науково-контрольного інституту  
біотехнології і штамів мікроорганізмів



З. С. Клестова