

ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертацію та автореферат
Кладницької Лариси Володимирівни
на тему „*Морфофункціональні властивості стовбурових клітин та їх вплив на пухлинний процес*” 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. Вивчення потенційних можливостей мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) дало можливість відкрити нові можливості клітинної терапії у гуманній та ветеринарній медицині. Джерелом МСК є червоний кістковий мозок, плацента, ендометрій, кордова кров, фетальна, жирова тканина, молочні зуби тощо. З'являється все більше даних відносно застосування стовбурових клітин у ветеринарній медицині при лікуванні остеоартритів, дилатаційної кардіоміопатії, хронічних нефритів тощо.

Ряд аспектів застосування стовбурових клітин у собак, та особливо у котів, ще залишається не з'ясованою. Відсутні стандарти визначення критичних характеристик МСК, отриманих від дрібних домашніх тварин. Остаточного не розроблені ефективні підходи виділення та отримання МСК різного походження. Відсутні чіткі рекомендації щодо визначення числа пасажів для культивування клітин, не встановлені остаточно маркерні білки, важливі для контролю якості клітин, призначених для трансплантації. Гостро стоїть питання щодо методів оцінки канцеропротективного, імуномодуляторного, метаболічного впливу на організм реципієнта інокульованих стовбурових клітин з терапевтичним спрямуванням.

Дисертаційна робота виконана у відповідності з науковою тематикою кафедри фізіології, патофізіології та імунології тварин Національного університету біоресурсів та природокористування в рамках завдання «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.); «Розробити нові способи стимуляції процесів відновлення ушкоджених тканин опорно-рухового апарату домашніх тварин методами клінічної терапії» (номер державної реєстрації 0118U000307, 2018– 2020 рр.).

Виходячи із напрямків досліджень, визначених у державних завданнях, авторка дисертаційної роботи поставила за мету вивчити морфофункціональні властивості стовбурових клітин тваринного

походження та їх системний вплив на пухлинний процес (морфологічні, функціональні, імунофенотипові показники мезенхімальних СК культури кісткового мозку, жирової, нервової тканин залежно від методів обробки первинного матеріалу та культивування за ранніх та пізніх пасажів; показники функціональних змін в організмі тварин-реципієнтів з експериментально перещепленою карциномою Льюїс за впливу алогенних стовбурових клітин).

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 Кладницької Лариси Володимирівни є актуальною, а отримані результати досліджень мають важливе теоретичне та практичне значення, оскільки вносять вагомий вклад в технологію отримання СК з жирової тканини коня, миші, з нервової тканини кота; оптимізацію технології отримання СК з червоного кісткового мозку миші.

Наукова новизна одержаних результатів. Наукова новизна дисертаційної роботи Кладницької Л.В. не викликає сумніву, а використання комплексних методів дослідження (експериментального моделювання карциноми легень Льюїс, зоотехнічні, морфологічні, цитологічні, імунологічні, біохімічні статистичні) дозволили дисертантці вивчити морфологічні і функціональні властивості мезенхімальних стовбурових клітин тваринного походження залежно від культури первинного матеріалу (жирова тканина, кістковий мозок, нервова тканина) та їх системний вплив на пухлинний процес в тварин з перещеплюваною карциномою легень Льюїс на стан інактивних тварин-реципієнтів.

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. Здобувачкою уперше проведено комплексне дослідження морфофункціональних властивостей стовбурових клітин та їх вплив на пухлинний процес

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

1. Розроблено нові методи отримання стовбурових клітин культури жирової та нервової тканини, основною відмінністю яких є збільшення контакту фрагментів первинного матеріалу з культуральним посудом, що супроводжується активними процесами колонієутворення та проліферативної активності.

2. Встановлено, що абдомінальна і підшкірна жирова тканина собаки є придатною для отримання адгезивної фракції клітин з високою проліферативною активністю.

3. Оптимальними умовами обробки та отримання стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку мишей є: градієнт щільності фіколу 1,074-1,076, за центрифугування 300 об/хв, з отриманням найбільшої кількості клітин з їх найвищою життєздатністю та індексом проліферації у

первинних культурах.

4. Визначено оптимальний склад середовища для кріоконсервування стовбурових клітин культури жирової тканини (90% фетальної сироватки бичків, 10% диметилсульфоксиду), що забезпечує після 30 добового зберігання виживаність, життєздатність клітин та індекс проліферації за послідуєчого культивування.

5. Уперше визначено, що морфофункціональний стан СК культури червоного кісткового мозку змінюється у процесі культивування, що засвідчує початок реплікативного старіння вже з 4 пасажу.

6. У процесі культивування змінюється також морфофункціональний стан СК жирової тканини, що засвідчує перші ознаки реплікативного старіння з 7 пасажу.

7. У клітинному циклі культури клітин кісткового мозку встановлено високі функціональні властивості, стабільність культури та зростання проліферативного пулу у фазі G0/G1.

8. З'ясовано, що стовбуром клітинам культури жирової тканини за ранніх пасажів властива висока експресія віментину, актину, кадгерину, катеніну та анти-апоптичного білка Bcl-2.

9. За показниками експресії ядерних, цитоплазматичних та мембранних білків стовбурові клітини культури нервової тканини відрізняється від МСК культури жирової тканини.

10. Встановлено, що СК культури червоного кісткового мозку, жирової та нервової тканин на ранніх пасажах мають спільні риси спектру жирних кислот, високе співвідношення мононенасиченої олеїнової до насиченої стеаринової кислоти.

11. Стовбурові клітини культури червоного кісткового мозку порівняно з такими жирової та нервової тканин мають вищий вміст ненасичених жирних кислот, менший вміст ω3 жирних кислот та вищий вміст ω6 жирних кислот.

12. Трансплантація СК культури жирової тканини та червоного кісткового мозку спричиняє підвищення активності сукцинатдегідрогенази мітохондрій гепатоцитів, що вказує на зростання мітотичної активності клітин.

13. Внутрішньовенне введення МСК культури жирової тканини та кісткового мозку призводить на перших етапах до короткочасного збільшення відносного індексу маси і вмісту лімфоїдних клітин у тимусі і селезінці тварин-реципієнтів, які поступово відновлюються до норми.

14. Уперше встановлено, що за впливу стовбурових клітин у тварин-реципієнтів з трансплантованою карциномою легень Льюїс, відбувається збільшення маси первинної пухлини, загального об'єму метастазів та швидкий перехід пухлинного процесу у васкулярну стадію.

15. Уперше встановлено, що застосування алогенних МСК культури кісткового мозку в мишей лінії C57BL/6 з трансплантованою метастатичною карциномою легень Льюїс призводить до порушення механізмів запрограмованої загибелі клітин, збільшення показників анеуплоїдії у

первинній пухлині, більш щільну васкуляризацію на одиницю площі пухлини, що вказує на активацію пухлинного процесу.

Наведені наукові положення можна віднести до фундаментальних теоретичних розробок дисертаційної роботи, які добре обґрунтовані фактичним матеріалом. Наукова новизна результатів підтверджена патентами на корисні моделі: «Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин з жирової тканини собаки»; «Спосіб отримання нейральних стовбурових клітин kota». Характерною особливістю наукових розробок дисертанта є те, що їх глибокий теоретичний зміст тісно пов'язаний з проблемами практики. Саме на це вказують висновки і пропозиції виробництву, наведені у дисертації та авторефераті.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані, проаналізовані та узагальнені дисертантом результати досліджень, представляють теоретичний інтерес і мають практичну значимість. Результати досліджень можуть бути використані у лабораторіях клітинних технологій з метою отримання клітинного матеріалу для трансплантації тваринам різних видів з прогнозованим ефектом, подальших наукових досліджень властивостей МСК; для оцінювання морфофункціональних властивостей СК перед їх використанням з науково-дослідною та терапевтичною метою; у клінічній практиці для корекції порушень функціонального стану органів, що супроводжується ішемією та імунної системи різного генезу.

Авторкою розроблені науково-методичні рекомендації «Методи видоспецифічної оцінки стовбурових клітин та їх застосування у ветеринарній клітинній регенеративній медицині»

Результати отриманих досліджень використовують у навчальному процесі та наукових дослідженнях на кафедрах і лабораторіях навчальних закладів України.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота Кладницької Л.В. викладена на 417 сторінках комп'ютерного набору і включає вступ, огляд літератури, розділ «Матеріал і методи дослідження», розділу власних досліджень, їх узагальнення та аналізу, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел та додатків. Робота ілюстрована 107 рисунками, 48 таблицями. Список використаних джерел літератури включає 487 найменування, у тому числі 422 з далекого зарубіжжя. На підставі аналізу дисертаційної роботи робимо висновок, що вона містить усі розділи, передбачені вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів» Постанови Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015р. та № 1159 від 30.12.2015р.) щодо її відповідності кваліфікаційної наукової роботи рівня докторської дисертації.

Вступ до дисертації присвячений обґрунтуванню важливості поглиблення і розширення досліджень, скерованих на вирішення питань морфології, функцій МСК, їх культивування, диференціації, консервування

та використання стовбурових клітин тваринного організму при опуховій хворобі.

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 58 сторінках дисертації. У підрозділах подана загальна характеристика стовбурових клітин, описані джерела отримання стовбурових клітин, жирнокислий склад ліпідів МСК, їх імуномодельючі властивості. Подана характеристика впливу МСК на пухлинний ріст. При цьому дисертантка наголошує, що не визначені характеристики МСК, які в повній мірі відображали б їх функціональні властивості особливо в організмі тварин-реципієнтів. Разом з тим вказується, що недостатньо вивчений вплив МСК на імунні реакції, ангиогенез, формування і модифікацію сполучної тканини. Недостатньо вивченим є на сьогодні вплив МСК на мікросередовище пухлин і на біологічні властивості самої пухлини.

Кладницька Л.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. «Вибір напрямків досліджень, матеріали та методи досліджень». У даному розділі (дисертація стор. 107-146) добре продумано та відображено науковий пошук дисертантки для досягнення поставленої мети. Дотримуючись методичної та логічної послідовності, дисертантка провела дослідження на 250 самцях лінійних мишей C57Bl/6 вагою 20–24 г віком 2–3 місяці; 35 собаках різних порід вагою 10–25 кг віком 10–18 місяців; 3 конях української верхової породи, вагою 400–450 кг віком 4–5 років, 15 новонароджених цуценятах та 12 кошенятах.

Описано обладнання, прилади, реагенти, які використовували в процесі досліджень, методи приготування розчину Дюльбеко, Ігла, розчину трипсину-EDTA. У першій серії дослідів авторка описує методику отримання первинного матеріалу, його обробку та культивування МСК культури жирової тканини собак, коня, культури нервової тканини kota, культури кісткового мозку миші *in vitro*; дослідження морфологічних та функціональних властивостей МСК. У другій серії дослідів дисертантка визначала біохімічні показники крові, функціональний стан імунних органів інтактних мишей за впливу МСК. У третій серії дослідів моделювала

карциному легені Льюїс мишам. Визначала вагу тварин, масу первинної пухлини, загальну кількість, об'єм та розміри метастазованих пухлин, досліджувала клітинний цикл, апоптоз, анеуплоїдію клітин первинної пухлини. Дисертантка проводила гістологічні дослідження м'язової тканини, ураженої трансплантованою карциномою легені Льюїс.

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 власних досліджень. Підрозділ 3.1. «Отримання стовбурових клітин та їх морфофункціональні особливості» (дисертація стор. 147-236), містить 16 підпунктів, в яких представлені 42 рисунки, 29 таблиць та зроблені висновки до підрозділу.

У підрозділі (підпункт 3.1.1, 3.1.2) дисертанткою описано, розроблений нею новий метод отримання МСК культури жирової та нервової тканин, де основною відмінністю від існуючих є культивування клітин у присутності фрагментів первинної тканини та збільшення її контакту з поверхнею культурального посуду. Цей метод забезпечує активну адгезію, проліферацію, колонієутворювальну здатність, уникнення ушкоджуючого механічного та хімічного впливів.

У підпунктах 3.1.3, 3.1.4., 3.1.5 дисертантка описує та порівнює функціональну активність МСК культури жирової тканини більшого сальника та підшкірної жирової тканини собаки залежно від умов обробки та культивування первинного матеріалу. Виявлено найвищу функціональну активність СК культури жирової тканини більшого сальника, отриманого модифікованим методом експланту на 14 добу культивування.

У підпункті 3.1.6. описано отримання первинного матеріалу та функціональну активність МСК культури підшкірної жирової тканини коня залежно від умов обробки та культивування первинного матеріалу. Дисертанткою встановлено, що за модифікованого методу експланту обробки жирової тканини коня та культивування можна отримати найбільшу кількість клітин з найвищою їх життєздатністю порівняно з ферментативною обробкою та методом експланту.

У підпункті 3.1.7. описана функціональна активність мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку залежно від умов обробки та культивування первинного матеріалу. Встановлено, що для отримання мезенхімальних стовбурових клітин з кісткового мозку лінійних мишей оптимальним є центрифугування первинної суспензії у градієнті щільності фіколу 1,074-1,076 з подальшим використанням середовища DMEM або RPMI.

У підпунктах 3.1.8., 3.1.9 представлена морфологія і функціональна активність та клітинний цикл МСК культури кісткового мозку мишей за різних пасажів культивування. Визначено, що життєздатність клітин в процесі культивування сягає високих показників (другий – четвертий пасажі), а із збільшенням кількості пасажів достовірно знижується починаючи із 7 пасажу (реплікативне старіння). За 12-го пасажу достовірно

знижуються показники кількості клітин проліферативного пулу. Дисертанткою встановлено зворотну корелятивну залежність між тривалістю періоду культивування і зменшенням життєздатності клітин.

У підпунктах 3.1.10. і 3.1.11 описана морфологія, функціональна активність та клітинний цикл МСК культури жирової тканини миші за різних пасажів культивування. Визначено, що СК культури жирової тканини змінюють свою морфологію і функціональний стан у процесі культивування. Високі показники життєздатності, високі адгезивні властивості, високий проліферативний потенціал, низька чутливість до індукції апоптозу МСК визначено на 2-4 пасажах, а із збільшенням кількості пасажів – ці показники знижуються.

У підпункті 3.1.12. подана імунофенотипова характеристика мультипотентних СК жирової тканини собак, на різних етапах культивування. Авторкою визначений спектр експресії білків поверхневих мембран та ядерних маркерів. Встановлена висока експресія віментину, актину, Ki-67, PCNA, CD44, антиапоптичного білка Bcl-2 за ранніх пасажів СК культури жирової тканини. За збільшення кількості пасажів культивування, експресія більшості визначених антигенів знижувалась, виявлено причинно-наслідкову залежність рівня експресії ядерних та цитоплазматичних білків СК

У підпунктах 3.1.13 і 3.1.14 подана імунофенотипова характеристика мультипотентних СК нервової тканини kota та кісткового мозку мишей на різних етапах культивування. Дисертанткою визначена в СК культури нервової тканини експресія більшості антигенів. Встановлено, що спектр СК культури нейральної і жирової тканини співпадає. Однак експресія окремих антигенів (PCNA, E – кадгерину, актину) є нижчою в СК культури нервової тканини. Показано, що СК культури нервової тканини відрізняються від МСК культури жирової тканини та кісткового мозку за проліферативною здатністю, рухливістю та активністю

У підпункті 3.1.15 описаний жирнокислотний склад ліпідів мультипотентних СК культури кісткового мозку, жирової та нервової тканин. Встановлено, що СК культури червоного кісткового мозку, жирової та нервової тканини на ранніх пасажах мають спільні риси спектру жирних кислот: високий вміст олеїнової кислоти; високе співвідношення мононенасиченої олеїнової до насиченої стеаринової кислоти; нездатність до подовження ланцюга насичених жирних кислот. Дисертанткою також встановлено, що СК культури червоного кісткового мозку мають вищий вміст ненасичених жирних кислот, менший вміст омега 3 жирних кислот та вищий вміст омега 6 жирних кислот порівняно із СК жирової та нервової тканин.

У підпункті 3.1.16. описана біологічна активність МСК культури жирової тканини за кріоконсервування методом вітрифікації при застосуванні кріосередовищ різного складу. Встановлено що оптимальним складом середовища для кріоконсервування СК культури жирової тканини є 90% фетальної сироватки телят і 10 % диметилсульфоксиду, що забезпечує

після 30 добового зберігання виживаність $2,37 \pm 0,03$ млн. клітин, життєздатність $79,2 \pm 2,03$ % та індекс проліферації $1,94 \pm 0,03$ за послідуєчого культивування.

Підрозділ 3.2. «Вплив мезенхімних стовбурових клітин на функціональний стан імунних органів мишей лінії C57B1/6» (дисертація стор. 240 - 263), містить 7 підпунктів, 16 рисунків, 6 таблиць та висновки до підрозділу.

У підпунктах 3.2.1. і 3.2.2. описано вплив мезенхімних клітин кісткового мозку та жирової тканини на функціональний стан імунних органів мишей лінії C57B1/6. Авторкою проведених досліджень встановлено, що системне введення МСК тканин кісткового мозку та жирової тканини впливає на стан органів імунної системи. Внутрішньовенне введення МСК культури ЖТ та КМ на перших етапах призводить до короточасного збільшення відносного індексу маси, кількості лімфоїдних клітин у тимусі та селезінці тварин-реципієнтів, які поступово відновлюються до норми або стан їх пригнічується. Відзначається також підвищення активності НВДФ-Н2-оксидази моноцитів/макрофагів, що є необхідною умовою для їх подальшого диференціювання в М2 макрофаги.

У підпункті 3.2.3. подана характеристика впливу алогенних МСК кісткового мозку та жирової тканини на функціональний стан імунних органів мишей лінії C57BL/6. МСК жирової тканини і кісткового мозку мають однаковий за спрямованістю вплив на імунну систему реципієнтів, однак відмінними є інтенсивність впливу на окремі ланки імунної системи: МСК культури кісткового мозку більш активні по відношенню до тимуса (Т-клітинний імунітет), МСК культури жирової тканини мають більш виразний вплив на селезінку, як орган В-ланки імунітету.

У підпункті 3.2.4. висвітлені біохімічні показники сироватки крові мишей лінії C57BL/6 та функціональний стан гепатоцитів за трансплантації алогенних МСК культури червоного кісткового мозку та жирової тканини. Дисертантка встановила, що за системного введення МСК культури КМ і ЖТ здоровим тваринам біохімічні показники сироватки крові залишаються в нормі, а окремі з них мають тенденцію до зниження (білірубін, сечовина, аспартатамінотрансфераза).

У підпункті 3.2.5. представлена активність сукцинатдегідрогенази внутрішньої мембрани мітохондрій печінки тварин за впливу алогенних МСК. Встановлено, що трансплантація культури клітин ЖТ спричиняє підвищення активності сукцинатдегідрогенази мітохондрій гепатоцитів мишей до $57,7 \pm 1,6$, тоді як СК культури кісткового мозку до $53,3 \pm 1,4$ мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]/mg \cdot xh$ порівняно з контролем, що вказує на зростання їх мітотичної активності.

У підпункті 3.2.6. показаний вплив трансплантації алогенних МСК на оксигензалежний метаболізм перитонеальних макрофагів мишей лінії C57B1/6. Визначено, що системне введення МСК призводить до різкого підвищення активності НАДФ-Н2-оксидази моноцитів/макрофагів, що є необхідною умовою для подальшого диференціювання в М2 макрофаги.

У підпункті 3.2.7. описаний вплив трансплантації алогенних МСК на розвиток пухлин у мишей лінії C57BL/6. Дисертантка проводила спостереження за дослідними тваринами протягом 3 місяців і нею не було зафіксовано появи пухлин в жодної із тварин.

Підрозділ 3.3. «Вплив мезенхімних стовбурових клітин на пухлинний процес на моделі метастазуючої карциноми Льюїс. Дисертація (стор. 263 – 302), містить 4 підпункти, 27 рисунків, 10 таблиць та висновки до підрозділу.

Підпункт 3.3.1. «Вплив мезенхімальних стовбурових клітин на швидкість росту і метастазування карциноми легені Льюїс». Дисертанткою виявлено, що за впливу стовбурових клітин у тварин-реципієнтів з трансплантованою карциномою легені Льюїс збільшується маса первинної пухлини до $2,57 \pm 0,21$ г, загальний об'єм метастазів до $29,6 \pm 6,50$ мм³ і відбувається швидкий перехід пухлинного процесу в васкулярну стадію, що вказує на активізацію пухлинного процесу.

Підпункт 3.3.2. «Мікроскопічні зміни в скелетних м'язах мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс». Встановлено, що на 24 добу після трансплантації пухлини в скелетні м'язи мишей розвинулась поліморфноклітинна саркома низького ступеня диференціації, з чіткими межами стосовно оточуючих тканин з ознаками некрозу та метастазування у вигляді осередків розростання пухлинних клітин поряд з кровоносними судинами

Підпункт 3.3.3. «Мікроскопічні зміни в скелетних м'язах мишей з трансплантованою карциномою легені Льюїс при застосуванні мезенхімних стовбурових клітин». Дисертанткою встановлено, що трансплантація алогенних мезенхімних стовбурових клітин культури кісткового мозку знижує рівень генетичної стабільності клітин первинної пухлини мишей C57BL/6 з перещепленою метастатичною карциномою легень Льюїс, що проявилось збільшенням показника анеуплоїдів у первинній пухлині та їх кількості серед клітин проліферативного пулу, що засвідчує більш злоякісний фенотип клітин первинної пухлини.

Підпункт 3.3.4. «Вплив алогенних мезенхімних стовбурових клітин на чутливість до індукції апоптозу та рівень генетичної стабільності клітин первинної пухлини мишей C57BL/6 з перещепленою карциномою легені Льюїса» На основі проведеного аналізу результатів дослідження, авторка виявила, що введення алогенних МСК культури кісткового мозку мишей C57BL/6 з трансплантованою карциномою легень Льюїс призводить до порушення механізмів запрограмованої загибелі клітин первинної пухлини з показником зниження апоптозу до $41,82 \pm 1,37$ %, що підтверджує активізацію пухлинного росту у 1,3 рази.

РОЗДІЛ 4. „Аналіз і узагальнення результатів дослідження” (дисертація стор. 303– 329). Дисертантка 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 внесла сама дисертантка. Авторка аргументовано порівнює одержані результати

досліджень із даними світової наукової літератури. Слід наголосити на тому, що дисертантка дає їм глибоке наукове пояснення. В цілому цей розділ викладено професійно, грамотно і характеризує здобувачку дисертації як всебічно підготовленого й ерудованого науковця.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертація Кладницької Лариси Володимирівни 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 та морфометричними показниками. Отримані результати мають вагоме значення для науки і практики. Все наведене вище дає підстави вважати, що викладені в дисертаційній роботі Кладницької Л.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 16) повністю впливають із результатів власних досліджень і дозволяють всесторонньо оцінити проведену комплексну роботу. На основі висновків дисертантом сформульовано пропозиції виробництву (стор. 336).

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 Кладницької Л.В. має важливе наукове й практичне значення. Оцінюючи практичну цінність даної роботи, вважаємо, що дисертантка при проведенні експериментально-теоретичних досліджень вирішила науково-практичну задачу, оскільки внесла значний вклад у вивчення морфофункціонального стану стовбурових клітин кісткового мозку, жирової, нервової тканин залежно від методів обробки первинного матеріалу та культивування за ранніх та пізніх пасажів а також функціональний стан організму та структурні зміни в тканинах тварин-реципієнтів з експериментальною перещепленою карциномою легені Льюїс за впливу алогенних СК.

Оцінюючи дисертаційну роботу Кладницької Л.В. в цілому позитивно необхідно зазначити, що поряд із аргументованими беззаперечними положеннями, трапляються твердження, які потребують додаткового уточнення при захисті дисертації. Окрім того при рецензуванні виявлені окремі недоліки та упущення:

- У розділі «Вибір напрямків досліджень, матеріали та методи виконання» слід вказати на деякі неточності. На ст. 141 пишете, що «Легені фіксували в розчині Буена (розчин для фіксації гістологічних препаратів, що представляє собою суміш насиченого водного розчину пікринової кислоти, формаліну і льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 15:5:1), витримували 24 години», а потрібно для фіксації взірців тканини. На ст. 143 гістологічні зрізи «накривали скельцями», а потрібно - накривали покривними скельцями. На ст. 118 пишете «Оцінку вмісту лімфоцитів у лімфоїдних органах проводили загальноприйнятим методом». Згідно методики Ви проводили оцінку кількості лімфоцитів а не їх вмісту.

- У підпункті 3.1.2. «Отримання стовбурових клітин культури нервової тканини». Ст. 149. Пишете: «Первинний матеріал – підготовлену нервову тканину головного мозку розділяли на фрагменти розміром 1-3 мм³, які розміщували в культуральних чашках». Тому прошу пояснити у котенят відбирається весь головний мозок kota чи окремі формації (мозочок, сенсомоторна кора, гіпоталумус тощо) для отримання нейральних стовбурових клітин kota? Чи має значення з яких ділянок (формацій) головного мозку проводиться відбір взірців для отримання нейральних СК?

- У підпункті 3.1.5, ст.163 «Порівняльна характеристика функціональної активності МСК культури жирової тканини більшого сальника та підшкірної» не дописано клітковини собак

- Назви окремих розділів громіздки, бажано їх скоротити. 3.1.6. Біологічна активність мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини за кріоконсервування методом вітрифікації при застосуванні кріосередовищ різного складу

- У підпунктах 3.2.1, 3.2.2 як в тексті так і назвах таблиць вживаєте слово «вміст лімфоїдних клітин». Згідно представленої методики – Ви проводили кількісне визначення лімфоїдних клітин у органах. Тому вважаю, що в цьому розділі потрібно було вживати не вміст а «кількість лімфоїдних клітин в тимусі, селезінці»

- Не усі скорочення представлені у списку скорочень і термінів, але автором використовуються у тексті, FITS, PE (стор. 210. FITS, PE).

На основі теоретичних обґрунтувань та проведених Вами узагальнень прошу дати відповідь на таке запитання:

- Чим зумовлене збільшення відносного індексу селезінки, тимусу та кількості в них лімфоїдних клітин на 7 і 18 доби за введення МСК?

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

Публікації основних результатів дисертації Основні матеріали дисертації опубліковані у 53 наукових працях, з яких 25 статей у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 1 стаття в інших наукових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 3 статті у наукових виданнях інших держав, включених до міжнародних наукометричних баз даних,

2 патентах на корисну модель; 1 методичних рекомендаціях і 21 тезах наукових доповідей.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам Все вище викладене дає підстави стверджувати, що незважаючи на зауваження, дисертаційна робота Кладницької Л.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 розкрито морфофункціональні властивості стовбурових клітин культури кісткового мозку, жирової та нервової тканин. На основі отриманих результатів досліджень дисертантка обґрунтувала факт негативного впливу алогенних МСК кісткового мозку мишам з трансплантованою метастатичною карциною легені Льюїс, оскільки введення МСК таким тваринам призводить до активізації пухлинного процесу і зниження апоптозу в первинній пухлині.

Проаналізувавши дисертаційну роботу і автореферат, вважаю, що за актуальністю, науковою новизною, обсягом досліджень, їх високим методичним рівнем, глибоким усебічним аналізом та обґрунтованістю одержаних результатів і положень, їх апробацією та висвітленням у наукових працях, теоретичною й практичною цінністю, належним оформленням, змістом висновків і пропозицій, робота Кладницької Лариси Володимирівни на тему: **«Морфофункціональні властивості стовбурових клітин та їх вплив на пухлинний процес»** повністю відповідає вимогам 10 «Порядку присудження наукових ступенів» Постанови Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015р. та № 1159 від 30.12.2015р.) щодо дисертацій, а її авторка заслуговує присудження наукового ступеня доктора ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин».

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

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

Львів. 19 жовтня 2020 року



Г. І. Коцюмбас
НАЧАЛЬНИК ВІДДІЛУ КАДРІВ
Львівського
національного університету
ветеринарної медицини
та біотехнологій
імені С. З. Гжицького
О. П. Гентош