

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію та автореферат

Шупика Олександра Васильовича

на тему: «Морфофункціональні зміни в ушкоджених тканинах ока тварин та активність репаративних процесів за впливу стовбурових клітин», 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. Розвиток клітинних технологій на основі стовбурових клітин сприяв створенню біотехнологічних методів клітинної терапії направленої на стимуляцію процесів відновлення втрачених функцій органами і тканинами.

Увеїт – запалення середньої (судинної) оболонки ока, яка складається з хоріоїдеї (*choroidea*), циліарного тіла (*corpus ciliaris*) і райдужної оболонки (*iris*). Скловидне тіло також може втягуватися у запальний процес. Часто є симптомом багатьох хвороб.

Кератит – запалення рогівки ока, що виявляється переважно її помутнінням, виразкою, болем і почервонінням ока. Може мати травматичне або інфекційне (герпес простий, аденовірусна інфекція, туберкульоз та ін.) походження. Характерний рогівковий синдром: виражена світлобоязнь, слезотеча, спазм повік (блефароспазм), біль різної інтенсивності, почервоніння ока навколо рогівки. На рогівці можуть бути інфільтрат, ерозія або виразки, які краще видно при закапуванні 0,5 % флюоресцеїну (фарбує інфільтрат та виразки у жовто-зелений колір). Увеїт та кератит діагностують переважно у собак, котів, рідше корів, коней, свиней та екзотичних тварин.

До теперішнього часу єдиним підходом до лікування кератиту у тварин є застосування різних антибіотиків, противірусних та протизапальних препаратів. Лікування зазвичай довге та не завжди призводить до повного одужання. Після тяжких кератитів назавжди залишається помутніння рогівки – більмо, яке суттєво знижує зір і погіршує косметичний вигляд ока тварини. Чимало кератитів мають рецидивний характер і кожна наступна атака запалення спричинює все більші зміни в рогівці. Найбільш тяжко піддаються лікуванню герпетичні, протозойні та грибкові кератити. Іноді консервативна медикаментозна терапія не дає жодних змін.

Лікування увеїту проводиться в залежності від тяжкості та перебігу. Часто використовують кортизоновмісні очні мазі, можливо, в поєднанні з безкортизоновими протизапальними препаратами у вигляді очних мазей або крапель. З метою попередження утворення спайок між райдужною оболонкою і кришталиком використовують також краплі, що розширюють зіницю (мідріатики). При тяжкому запаленні райдужної оболонки необхідні ін'єкції кортизону в кон'юнктиву і/або прийом кортизону у таблетованому вигляді. Збереження зору іноді неможливе без застосування високих доз

глюкокортикостероїдів. При повторних випадках захворювання може рекомендуватися тривале лікування низькими дозами кортикостероїдів і/або системна імуносупресивна терапія (метотрексат та ін.). Якщо причиною увеїту є бактеріальний чинник проводиться тривала антибіотикотерапія достатньо високими дозами, в іншому разі можливий рецидив. Вибір антибіотиків залежить від збудника.

У зв'язку з цим виникає необхідність пошуку більш досконалих методів регенеративних способів ока у тварин за увеїтів та кератитів, зокрема застосування мезенхімальних стовбурових клітин, яка дозволяє уникнути вищеперерахованих ускладнень. На думку вітчизняних та зарубіжних авторів, цей метод є найбільш ефективний та реалістичний з найменшими ризиками ускладнень у тварин.

Застосування мезенхімальних стовбурових клітин у ветеринарній медицині за увеїту та кератиту, в недалекому майбутньому має зайняти своє достойне місце в комплексному лікуванні тварин, що і потребує розроблення нових та удосконалення вже існуючих методів та впровадження їх в клінічну практику. Тому дослідження властивостей стовбурових клітин у тварин за увеїту та кератиту на даний час є досить актуальним і своєчасним завданням, яке сприятиме розробленню науково обґрунтованих і ефективних методів клітинної терапії у ветеринарній медицині.

Дисертаційна робота виконувалась, як складова частина науково-дослідних робіт кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України за темою: №110/76-Ф «Дослідити особливості коригуючої дії введених стовбурових клітин на патологічно змінені структури і функції тканин в організмі тварин-реципієнтів» (код і номер державної реєстрації – 00493706 №0115 U 003476, 2015–2017 рр.), наказ МОН України від 31.10.2014 р. №1243.

Тема дисертації сформульована вірно. Шупик О. В. провів доклінічні дослідження впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на перебіг відновлювальних процесів у оці кролів за експериментального увеїту та кератиту. Представлено також результати клінічних досліджень за спонтанного увеїту та кератиту та впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на перебіг відновлювальних процесів у оці в собак та котів.

Автором дисертації вивчено вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на відновлювальні процеси ока кролів за увеїту та кератиту при застосуванні їх з лікувальною метою після експериментального застосування, а також за спонтанного увеїту та кератиту у собак та котів.

Дисертантом проведено ґрунтовні клінічні дослідження за показниками (огляд тварин, тест Шиммера, біомікроскопія щілинною лампою, офтальмоскопія, флюорисцеїновий тест Зейделя, тонометрія, сонографія), гістологічними (виготовлення та фарбування зрізів, мікроскопія) вперше досліджено вплив алогенних мезенхімних стовбурових клітин на перебіг репаративних процесів у оці кролів за експериментального увеїту/кератиту, а

також у собак за спонтанного увеїту/кератиту. Вперше проведено випробування ефективності різних методів трансплантації алогенних мезенхімних стовбурових клітин (в тенозовий простір, субкон'юнктивально, інтравітреально, передню камеру ока) і застосування амніотичної оболонки та екстракту гомогенізованої амніотичної оболонки у формі гелю для стимуляції регенеративних процесів.

Аналіз змісту дисертації та її методичного рівня. Дисертаційна робота викладена на 189 сторінках комп'ютерного тексту, яка складається з анотації, змісту, переліку умовних скорочень, вступу та 4 розділів: огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, узагальнення і аналізу результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел та додатків. Список використаної літератури налічує 233 джерела, у тому числі 96 – латиницею. Дисертаційна робота ілюстрована 9 таблицями, 3 схемами та 102 рисунками.

У вступній частині автор обґрунтував актуальність теми, чітко виклав мету і практичне значення отриманих даних, свій особистий внесок при виконанні дисертаційної роботи, апробацію результатів дослідження та їх публікацію.

Розділ 1 „Огляд літератури” (ст. 25 – 63) містить два підрозділи. У першому підрозділі описано патогенез, етіологія, основні клінічні симптоми, синдроми та сучасні методи лікування увеїту та кератиту. У другому підрозділі подано характеристику стовбурових клітин *in vivo*, *in vitro* та після трансплантації.

З аналізу літератури видно, що маловивченим є питання застосування стовбурових клітин при клінічній формі увеїту та кератиту в тварин. Разом з тим автор відзначає, що у клініцистів ветеринарних клінік України мала інформативність щодо діагностики і лікування дисфункції ока за кератиту та увеїту серед тварин різних видів. Це пов'язано з відсутністю належних методів діагностики в тварин, що призводить до помилкової діагностики і відповідно неправильно вибраного лікування, яке веде до погіршення їх здоров'я і не рідко до повної втрати зору.

Аналіз результатів наукових досліджень і клінічних випробувань свідчить про те, що трансплантація мезенхімальних стовбурових клітин є перспективним сучасним напрямком розвитку ветеринарної науки, а новітні технології клітинної інженерії можуть бути запропоновані, як високотехнологічний метод надання ветеринарної допомоги тваринам із різноманітною патологією ока. Залишаються суперечливими питання щодо методів введення стовбурових клітин за кератитів та увеїтів. Ці питання є актуальними і потребують розроблення нових методів діагностики та лікування дисфункції ока, як при ускладненні так і в початкових стадіях захворювань за увеїту та кератиту, шляхом застосування мезенхімальних стовбурових клітин.

В цілому, розділ «Огляд літератури» написаний на високому фаховому рівні, що свідчить про ерудицію дисертанта у питаннях біологічних властивостей стовбурових клітин та увеїту і кератиту.

У розділі II. „Вибір напрямків дослідження. Матеріал і методи виконання роботи” (ст. 64 – 77) вказано, що експериментальна частина роботи виконувалась на базі кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка, а також у віварії НУБіП України. Окремі фрагменти досліджень виконані в клініці та НВЛ «Зооцентр» ВСП НУБіП України «Немішаївський фаховий коледж», на базі клінічної лабораторії ДУ Національного Інституту хірургії і трансплантології О. О. Шалімова та в Клінічному центрі Університету ТІНО (Ганновер, Німеччина).

Дослідження проведено в три етапи (чотири серії досліджень):

- 1) моделювання експериментального кератиту/увеїту у кролів;
- 2) формування дослідних груп, проведення діагностичних досліджень, призначення лікування тварин із експериментальним кератитом/ увеїтом.
- 3) клінічні випробування методу застосування аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин для відновлення функціональної здатності ока у собак за спонтанних випадків увеїту та кератиту.

В дослідях використано 90 кролів породи Шиншила віком 3,5 місяця з масою тіла в середньому 2,5–3 кг, а також 10 собак із спонтанним увеїтом/кератитом. Умови утримання дослідних тварин та використання їх в експериментах відповідали вимогам чинних вітчизняних нормативно-правових документів та Директиви №2010/63/ЄС «Про захист тварин, що використовуються з науковою метою».

Експериментальний увеїт/кератит у кролів моделювали УФ лампою ДРТ- 240 довгохвильовими променями UVA та інсталяцією патогенного штаму *Staphylococcus aureus* 105 КУО в 1 мл. на пошкоджене око. Через 24 години після інфікування клітинною культурою у 100 % кроликів діагностували бактеріальний кон'юнктивіт. На 3 добу спостерігали, нерівномірне помутніння з явищами вогнищевої інфільтрації та набряк строми і чітко виражений увеїт, ускладнений бактеріальним кератитом на 7 добу.

Було проведено чотири серії досліджень. В першій серії досліджень тварини із експериментальним увеїтом розподілили на сім дослідних груп. Тваринам першої дослідної групи застосовували одноразове введення 1×10^6 млн. аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин в тенонівий простір; тваринам другої дослідної групи одноразово вводили 1×10^6 млн. аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин в субкон'юнктивальний простір; тваринам третьої дослідної групи одноразово вводили 1×10^6 млн. аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин інтравітреально; тваринам четвертої дослідної групи вводили одноразово 1×10^6 млн. аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин в передню камеру ока; тваринам п'ятої дослідної групи призначили традиційне лікування (щоденне закапування генталяйн 0,4 %, і ципронорм 4–6 разів на добу); тваринам шостої дослідної групи (контрольної) групи закапували ізотонічний розчин 4–6 разів на добу. Крім того, в дослідях від початку і до закінчення знаходилась також сьома група кролів – інтактні тварини.

У розділі II. „Вибір напрямків дослідження. Матеріал і методи виконання роботи” (ст. 64 – 77) вказано, що експериментальна частина роботи виконувалась на базі кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка, а також у віварії НУБіП України. Окремі фрагменти досліджень виконані в клініці та НВЛ «Зооцентр» ВСП НУБіП України «Немішайвський фаховий коледж», на базі клінічної лабораторії ДУ Національного Інституту хірургії і трансплантології О. О. Шалімова та в Клінічному центрі Університету ТІНО (Ганновер, Німеччина).

Дослідження проведено в три етапи (чотири серії досліджень):

- 1) моделювання експериментального кератиту/увеїту у кролів;
- 2) формування дослідних груп, проведення діагностичних досліджень, призначення лікування тварин із експериментальним кератитом/ увеїтом.
- 3) клінічні випробування методу застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин для відновлення функціональної здатності ока у собак за спонтанних випадків увеїту та кератиту.

В досліді використано 90 кролів породи Шиншила віком 3,5 місяця з масою тіла в середньому 2,5–3 кг, а також 10 собак із спонтанним увеїтом/кератитом. Умови утримання дослідних тварин та використання їх в експериментах відповідали вимогам чинних вітчизняних нормативно-правових документів та Директиви №2010/63/ЄС «Про захист тварин, що використовуються з науковою метою».

Експериментальний увеїт/кератит у кролів моделювали УФ лампою ДРТ- 240 довгохвильовими променями UVA та інсталяцією патогенного штаму *Staphylococcus aureus* 105 КУО в 1 мл. на пошкоджене око. Через 24 години після інфікування клітинною культурою у 100 % кроликів діагностували бактеріальний кон'юнктивіт. На 3 добу спостерігали, нерівномірне помутніння з явищами вогнищевої інфільтрації та набряк строми і чітко виражений увеїт, ускладнений бактеріальним кератитом на 7 добу.

Було проведено чотири серії досліджень. В першій серії досліджень тварини із експериментальним увеїтом розподілили на сім дослідних груп. Тваринам першої дослідної групи застосовували одноразове введення 1×10^6 млн. алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в тенонівий простір; тваринам другої дослідної групи одноразово вводили 1×10^6 млн. алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в субкон'юнктивальний простір; тваринам третьої дослідної групи одноразово вводили 1×10^6 млн. алогенних мезенхімальних стовбурових клітин інтравітреально; тваринам четвертої дослідної групи вводили одноразово 1×10^6 млн. алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в передню камеру ока; тваринам п'ятої дослідної групи призначили традиційне лікування (щоденне закапування гентайну 0,4 %, і ципронорм 4–6 разів на добу); тваринам шостої дослідної групи (контрольної) групи закапували ізотонічний розчин 4–6 разів на добу. Крім того, в досліді від початку і до закінчення знаходилась також сьома група кролів – інтактні тварини.

В другій серії досліджень дисертант досліджував ефективність використання амніотичної оболонки за експериментального кератиту та увеїту. З цією метою тварини із експериментальним кератитом розподілили на шість дослідних груп. Тваринам першої дослідної групи трансплантат амніотичної оболонки наносили на ушкоджену рогівку, використовуючи техніку пошарової трансплантації; тваринам другої дослідної групи трансплантували амніотичну оболонку методом біологічного покриття; тваринам третьої дослідної групи застосовували екстракт амніотичної оболонки з очною лінзою; тваринам четвертої дослідної групи призначали традиційне лікування (щоденне закапування генталайн 0,4 %, і ципронорм 4–6 разів на добу); тваринам п'ятої дослідної групи (контроль) застосовували закапування ізотонічного розчину 4–6 разів на добу; тварини шостої дослідної групи - інтактні тварини.

В третю та четверту серію дисертант проводив доклінічні випробування результатів експериментальних досліджень на собаках із клінічними проявами кератиту/увеїту спонтанного походження (клінічні випадки). Вивчали вплив трансплантованих алогенних мезенхімальних стовбурових клітин (за увеїту) та алогенної амніотичної оболонки (за кератиту) на активність відновлювальних процесів у патологічно змінених тканинах ока.

Для отримання необхідної кількості алогенних мезенхімальних стовбурових клітин із кісткового мозку та амніотичної оболонки було використано в якості донорів 3 кролів та одного безпородного пса. Кістковий мозок для отримання мезенхімальних стовбурових клітин відбирали у тварин за методами, розробленими співробітниками НУБіП України (А. Й. Мазуркевич, Бокотько Р. Р., Савчук Т. Л, та ін. «Клітинні технології у ветеринарній медицині» Київ–2014). Статистичну обробку отриманих цифрових даних здійснювали за допомогою пакету статистичних програм *Microsoft Excel*.

Дисертантом застосовано методики, які адекватні меті та завданням дисертації і є достатньо інформативними та специфічними для глибокого розкриття особливостей застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин за увеїту та кератиту.

Слушно зауважити, що в процесі роботи, дисертантом захищені два патенти на корисну модель №141623 від 27.04.2020 «Спосіб застосування мезенхімальних стовбурових клітин для репаративних процесів ока у собак та котів за різного перебігу увеїту», №139673 від 10.01.2020 «Спосіб відновлення рогівки ока у собак та котів за ерозій, виразок та хімічних опіків, за допомогою амніотичної оболонки плода» Отже, схема досліджень, а також використання вказаних методик дозволили дисертанту отримати достовірні дані, які, поза усяким сумнівом, мають наукове та прикладне значення. Розділ містить 3 рисунки.

Розділ III „Результати власних досліджень” висвітлено у шести підрозділах (ст. 78 – 139) та висновків до розділу. У *першому підрозділі* автором представлена динаміка основних клініко-біохімічних показників за

експериментального кератиту та увеїту. Підрозділ містить два підпункти, в яких проведено аналіз основних клінічних показників за експериментального увеїту та кератиту на 7, 14, 30, доби експерименту. Було досліджено основні показники, які відображають функціональний стан ока, а саме: визначали глибину та масштаб ушкодження поверхневого шару рогівки, кількість кон'юнктивальних виділень та їх характер, збільшення та зменшення внутрішньоочного тиску, стан кон'юктиви та строми рогівки, запальну інфільтрацію та ступінь васкуляризації, ступінь оклюзії судин, деформацію очного яблука та камер, наявність внутрішньої ексудації та екстравазації крові в камерах ока, внаслідок запального процесу.

Дисертантом встановлено найбільш вірогідне зниження запального процесу в експериментально змодельованому увеїті та кератиті за введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин вже на 7 добу, а на 30 добу повну відсутності.

Отримані результати досліджень підтверджені рисунками та таблицями.

У другому підрозділі дисертантом представлені результати досліджень активності відновлення структури і функції ока залежно від способу введення алогенних мезенхімальних клітин. Підрозділ містить п'ять підпунктів, в яких подані результати вдосконаленого методу моделювання увеїту та кератиту у кролів, особливості змін мікроскопічної структури ока за експериментального кератиту та увеїту в кролів, застосування амніотичної оболонки у тварин за експериментального кератиту та за лікування традиційним способом.

Розроблений і використаний дисертантом в дослідженнях оригінальний метод моделювання гострої форми кератиту та увеїту у кролів забезпечив проведення в дослідженнях порівняльної клініко-морфологічної оцінки репаративних процесів в рогівці ока, при пошкодженні різного масштабу не тільки рогівки, а й лімба і внутрішніх тканин в передній камері ока, відображає суть відновлюваних процесів з точки зору доказової медицини, а дані, отримані при проведенні експерименту, можуть бути використані в подальших наукових експериментах.

Дисертантом встановлено, що після трансплантації алогенних мезенхімальних стовбурових клітин за увеїту вже на 7 добу відновлюється кровопостачання до судинної оболонки, стабілізуються процеси обміну рідинами між камерами ока та увеального тракту, що відновлює функцію акомодатії та всіх рефлексів, зникають явища неоваскуляризації рогівки та міозу зіниці ока та відновлюється типовий рисунок райдужної оболонки.

Встановлено морфологічні зміни в тканинах ока лабораторних тварин за експериментального кератиту/увеїту, які характеризуються типовими для запального процесу, його стадійності (альтерація, судинна реакція, проліферація), що підтверджується результатами гістологічних досліджень. Застосування комплексу діагностичних досліджень які поєднують клінічний огляд, інструментальні методи (тест Шиммера, біомікроскопія щілинною лампою, офтальмоскопія, флюоресцеїновий тест Зейделя, тонометрія,

сонографія) дозволяють з великою достовірністю визначати характер морфофункціональних змін в тканинах ока. Підрозділ ілюстрований рисунками та таблицями.

У *третьому підрозділі* подано динаміка основних показників відновлення ока тварин за увеїту та кератиту. За впливу трансплантованих алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у 94 % дослідних тварин патологічний процес в тканинах ока за експериментального кератиту/увеїту вже через 30 діб завершувався повним відновленням функціональної здатності ока, про що свідчать показники інструментальної діагностики та гістологічних досліджень. Отримані результати досліджень підтверджені рисунками та відповідними таблицями.

Четвертий підрозділ присвячений вивченню особливостям змін мікроскопічної структури ока у тварин за експериментального увеїту та кератиту. Дисертантом за мікроструктурного вивчення ока у кролів за експериментального увеїту та кератиту виявлено вже на 7 добу після трансплантації галогенних мезенхімальних стовбурових клітин чітке структурування переднього епітелію зі зменшенням хвилеподібності епітеліального покриву, налагодження структури всіх шарів рогівки, яке відбувається завдяки активній диференціації епітеліоцитів, зменшення товщини її строми, спостерігається вирівнювання колагенових фібрил дисцетомової оболонки і відновлення боуменової мембрани. У кролів, яким вводили мезенхімальні стовбурові клітини різними способами відзначалось прискорення регенераторних процесів за увеїту та кератиту, порівняно з групою тварин із традиційними методами лікування. Найбільш активно відновлювальні процеси в структурах ока відзначались за введення мезенхімальних стовбурових клітин у передню камеру ока та в теноновий простір, безпосередньо в епіцентр запального процесу. Вона нижча за введення інтравітреально та субкон'юнктивально, про що свідчать показники, сонографічних методів дослідження, щільної світлової біомікроскопії та тонометрії та підтверджено гістологічно. Отримані результати досліджень підтверджені рисунками та таблицями.

П'ятий підрозділ присвячений вивченню ефективності трансплантації алогенних мезенхімальних стовбурових клітин (за увеїту) та алогенної амніотичної оболонки (за кератиту) в залежності від патологічного процесу за клінічних випадків кератиту в собак та активність відновлювальних процесів у патологічно змінених тканинах ока.

Дисертант проводив доклінічні випробування результатів експериментальних досліджень на собаках із клінічними проявами кератиту/увеїту спонтанного походження (клінічні випадки). У розділі представлено таблиці та рисунки.

Виявлено, що найефективнішим способом регенерації пошкоджених поверхневих шарів рогівки за кератиту у собак, являється застосування алогенної галогенної амніотичної оболонки технікою біологічного покриття хірургічним методом та застосування екстракту гомогенізованої амніотичної

оболонки у формі гелю, які сприяють повній епітелізації поверхні ушкодженої рогівки вже на 30 добу.

Випробування методів відновлення функціонального стану ока за експериментального кератиту/увеїту в клініці з використанням собак із кератитами, увеїтами та іншими хронічними патологічними процесами очей показали високу лікувально-відновлюючу ефективність аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин та галогенної амніотичної оболонки в порівнянні із традиційним методом лікування відповідних хвороб очей.

У шостому підрозділі показано ефективність трансплантованих аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин та амніотичної оболонки за різних методів введення та імунна відповідь на їх застосування.

Порівняння дисертантом ефективності методів застосування аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин та аlogenної амніотичної оболонки з традиційними методами лікування у відновленні структури і функції патологічно змінених тканин ока за експериментального та спонтанного кератиту/увеїту у лабораторних тварин і собак показало суттєві переваги методів з використанням аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин та аlogenної амніотичної оболонки.

За результатами імунологічних досліджень доведено, що введення аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин та трансплантації амніотичної оболонки не викликало з боку тварин-реципієнтів імунної відповіді впродовж всього періоду досліджень, на що вказують результати досліджень вмісту імуноглобулінів трьох класів A(IgA), M(IgM), G ((IgG) у сироватці крові дослідних тварин та відсутність будь-яких алергічних реакцій.

Випробування дисертантом методів відновлення функціонального стану ока за експериментального кератиту/увеїту в клініці з використанням собак із кератитами, увеїтами та іншими хронічними патологічними процесами очей показали високу лікувально-відновлюючу ефективність аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин та галогенної амніотичної оболонки в порівнянні із традиційним методом лікування відповідних хвороб очей.

Розділ IV „Аналіз та узагальнення одержаних результатів досліджень” (ст. 141 – 147). Дисертантом теоретично узагальнено і обґрунтовано особливості відновлення структури ока, із застосуванням мезенхімальних стовбурових клітин та аlogenної амніотичної оболонки за кератиту та увеїту.

На основі проведених досліджень за показниками (огляд тварин, тест Шиммера, біомікроскопія щілинною лампою, офтальмоскопія, флюорисцеїновий тест Зейделя, тонометрія, сонографія), гістологічними (виготовлення та фарбування зрізів, мікроскопія) на 7, 14 та 30 добу експерименту дисертант отримав об'єктивні результати з оцінки особливостей відновлювальних процесів ока за впливу аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин, введених різними способами, порівняно з традиційними методами лікування та застосування аlogenної амніотичної

оболонки а також екстракту гомогенізованої амніотичної оболонки в формі гелю. Встановлено, що за введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин різними способами, найвища активність регенеративних процесів за переднього увеїту спостерігаються після введення мезенхімальних стовбурових клітин в передню камеру ока та в тенозовий простір, безпосередньо в епіцентр запального процесу. Вона нижча за введення інтравітреально та субкон'юнктивально, про що свідчать показники, сонографічних методів дослідження, щільності світлової біомікроскопії та тонометрії та підтверджено гістологічно.

Автором доведено, що за введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у передню камеру ока та в тенозовий простір, безпосередньо в епіцентр запального процесу за увеїту та кератиту, процеси відновлення інтенсивніше виражені ніж після введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин інтравітреально та субкон'юнктивально.

Доведено дисертантом високу лікувально-відновлюючу ефективність алогенних мезенхімальних стовбурових клітин та галогенної амніотичної оболонки й екстракту гомогенізованої амніотичної оболонки у формі гелю в порівнянні із традиційним методом лікування відповідних хвороб очей.

Важливо підкреслити, що при виконанні дисертаційної роботи, дисертантом використано 90 кролів породи шиншила віком 3,5 місяці, з масою тіла в середньому 2,5–3 кг, а також 10 собак із спонтанним увеїтом та кератитом. Проведено детальні дослідження клінічних показників, гістоструктури ока, що дало можливість отримати достовірні результати. Дисертант вміло поєднує власні експериментальні дані з наявними літературними джерелами і на належному рівні інтерпретує результати досліджень.

Наукове і прикладне значення отриманих результатів Шупиком Олександром Васильовичем полягає в тому, що вони розкривають біологічні властивості відновлювальних процесів у оці за експериментального кератиту та увеїту, що дало можливість апробувати за спонтанного кератиту/увеїту на собаках в клінічній ветеринарній практиці. У цілому все це дозволяє дати позитивну оцінку дисертаційній роботі Шупика О. В.

Даючи загалом, високу позитивну оцінку дисертаційній роботі Шупика О. В. необхідно вказати на окремі недоліки та упущення.

* У розділі „Вибір напрямків дослідження. Матеріал і методи виконання роботи” слід відзначити неузгодженість текстів дисертації та автореферату. У дисертації (ст. 65) вказуєте, що проводили чотири етапи дослідів, а в авторефераті (ст. 4) у чотири серії.

* Разом з тим у дисертації не вказано від собаки якої вікової групи брали кістковий мозок для культивування мезенхімальних стовбурових клітин і в подальшому для їх трансплантації.

* В авторефераті дуже стисло подаєте матеріали і методи дослідження, при тому що зроблений дуже великий об'єм досліджень. Все-таки необхідно було вказати більш детально в чому фіксували взірці ока кролів за експериментального увеїту та кератиту і чим фарбували гістозрізи.

* З яких тварин Ви брали амніотичну оболонку та якого віку була тварина на час відбирання алогенної амніотичної оболонки для подальшої трансплантації її за лікування увеїту та кератиту в собак та кролів.

* Чи застосовували Ви від іншого виду тварин амніотичну оболонку за лікування кератиту та увеїту в кролів та собак.

* Слушно зауважити, що на ст. 99, в тексті описуючи мікроструктурні зміни в оці кроля за експериментального кератиту та увеїту Ви подаєте характеристику в такій послідовності «оцінюючи гістологічну структури очей кролів за експериментального увеїту та керату (рисунок 3.35), визначали велику активність фібропластичних процесів, викликаних опіком та секундарною інфекцією, що викликали руйнування переднього епітелію, нерівномірне тяжіння по всій довжині бауменової мембрани». Тут слід було спочатку описати дистрофічні процеси в покривному епітелії та стромі ока, які передують саме увеїту та кератиту.

* На рис. 3.36, зробленого з гістопрепарату око кроля за експериментального увеїту та кератиту після введення мезенхімальних стовбурових клітин в тенонівий простір, 7 доба, гістоструктура не чітка і не відображає тих змін, які вказані в підписах.

* Слушно зауважити, що мікроструктурні зміни представлені на рис. 3.36 і рис. 3.38 при збільшенні 50 не візуалізуються. Тому вказані у підписах під рисунком зміни не повністю відповідають наявному. Щоб показовим був мікропроцес на мікрофотографіях потрібно фотофіксацію робити при збільшенні 400.

* Мікроструктура на рис. 3.42, рис. 3.43, рис. 3.44 представлена за збільшення 50, а під рисункам вказано збільшення 100.

* Методики визначення відновлення рогівки ока собак і котів за ерозії, виразок і хімічних опіків одні і ті ж самі.

* У дисертації ви використовували бальну шкалу. Дана бальна шкала розроблена Вами чи запозичена.

* У висновку до літературного огляду було б бажано більш чітко виділити ту частку питань, які залишились поза увагою дослідників і свідчать про актуальність роботи.

* В літературному огляді було б бажано однаково оформляти посилання на літературні джерела у квадратних дужках (ст. 54)

* Трапляються окремі синтаксично-орфографічні помилки:

У цілому, дисертант виконав важливу наукову роботу, результати якої мають як теоретичне, так і практичне значення. Наявні окремі зауваження не є принциповими і не зменшують наукової цінності та проблемного значення виконаної роботи. Сподіваємось, що висловлені оцінка та зауваження сприятимуть подальшому вдосконаленню дисертанта.

Матеріали дисертації опубліковані в 10 наукових працях, з яких 5 статей у наукових фахових виданнях України, у тому числі включених до міжнародних наукометричних баз даних, стаття у науковому виданні, включеному до міжнародних наукометричних баз даних Scopus, 2 патенти

України на корисну модель, 2 тези наукових доповідей. Автореферат відображає основний зміст дисертації.

Загальний висновок на дисертацію

Рецензована робота є завершеною науковою працею, яка за обсягом, науковим і методичним рівнем, актуальністю проведених досліджень, новизною одержаних даних і їх практичним значенням відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року № 567, а її автор **Шупик Олександр Васильович** заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин».

Офіційний опонент:

ДУ «Національний інститут хірургії

та трансплантології імені О. О. Шалімова»

Національна академія медичних наук України,

старший науковий співробітник,

кандидат медичних наук



А. В. РАТУШНЮК