

## Отзыв

официального оппонента доктора биологических наук, профессора **Рябых Владимира Павловича** на диссертационную работу **Левченко Владимира Михайловича "Сравнительная оценка морфофункциональных свойств фибробластов сельскохозяйственных животных"** по специальности 06.02.01. - диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных.

**Актуальность проблемы (избранной темы).** В последние годы в биологии и медицине широким фронтом разрабатываются клеточные технологии, с которыми связывают большие надежды. Однако в животноводстве разработка клеточных технологий пока значительно отстаёт от медицины. Основными клетками для получения стволовых клеток **взрослых особей**, как человека, так и животных являются дермальные фибробласты, которые используют для получения индуцированных плюрипотентных клеток и для получения эмбриональных стволовых клеток в результате репрограммирования генома соматических клеток взрослых особей, путём трансплантации ядер этих клеток в энуклеированные ооциты. Кроме того, в ветеринарии дермальные фибробласты могут быть использованы для лечения различных повреждений кожи животных.

Исходя из вышеизложенного, направление исследований Левченко В.М. является в достаточной степени **актуальным**.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.**

Автором проделан большой объём работы по получению и изучению динамики развития дермальных фибробластов овец, свиней и крупного рогатого скота *in vitro*. Проведены сравнительные исследования функциональной активности культур дермальных фибробластов разных видов сельскохозяйственных животных, включая изучение скорости адгезии клеток к поверхности культуральных флаконов, жизнеспособности клеток по энтропийному эквиваленту и синтеза проколлагена.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность подтверждены **чёткими экспериментами** по изучению динамики развития дермальных фибробластов основных видов сельскохозяйственных животных (овцы, свиньи, крупный рогатый скот). Исследования проведены автором на высоком методическом уровне с использованием современного сертифицированного оборудования.

**Выводы и рекомендации**, сформулированные в диссертации, обоснованно вытекают из результатов исследований.

**Достоверность** полученных автором результатов не вызывает сомнений и подтверждена статистической обработкой. Результаты исследований (3 статьи) опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и апробированы на специализированных отраслевых научных конференциях.

Содержание автореферата полностью соответствует содержанию диссертации. Статьи, опубликованные автором, в полной мере соответствуют результатам исследований изложенных в диссертации.

**Научная новизна** исследований Левченко В.М. состоит в том, что им впервые проведены сравнительные исследования морфологической и функциональной активности дермальных фибробластов, культивируемых *in vitro*, полученных от основных видов сельскохозяйственных животных. Определённая часть результатов, полученных автором, носят **фундаментальный характер**. Особо следует отметить, проведенные автором исследования по оценке жизнеспособности дермальных фибробластов в культуре по энтропийному эквиваленту.

Диссертация Левченко В.М. является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение научной задачи, имеющей значение для развития клеточных технологий для биологии и ветеринарии основных видов сельскохозяйственных животных (овцы, свиньи, крупный рогатый скот).



Диссертация Левченко В.М. выполнена автором самостоятельно на 85% и написана лично. Работа обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты о динамике развития дермальных фибробластов овец, свиней и крупного рогатого скота *in vitro* и положения, выдвигаемые для публичной защиты. Предложенные автором диссертации решения в достаточной степени аргументированы и оценены в сравнении с другими известными решениями (прототипами) данной проблемы.

Несмотря на высокую оценку полученных автором результатов исследований считаю необходимым сделать некоторые замечания и пожелания.

1. Как известно, качество любых исследований определяется правильностью методики работы, поэтому методы исследований должны быть изложены подробно и чётко, чтобы любому специалисту было видно - правильно ли поставлен эксперимент и, следовательно, корректны ли полученные результаты.

В разделе "Методы исследований" необходимо более подробно изложить методику, по которой проводили получение дермальных фибробластов животных *in vitro*, а не просто дать ссылку на патент Ткачук с соавторами и чётко выделить, где заимствованные методические приёмы из Патента (Ткачук и соавт.) и, где модификации автора. В диссертациях принято давать ссылки только на широко известные общепринятые методы, но не на малоизвестные патенты, а методики, которые использовал автор в своей работе излагать как можно подробнее. В настоящее время в России, в отличие от Советского Союза, Патенты на изобретение получить стало не так сложно, поэтому принимать методики, изложенные в Патенте, за абсолютную истину не всегда оправдано. Пример на лицо, Ткачук и соавторы оформили Патент, а по данным автора диссертации культура клеток, получаемая по этой методике, прорастает. Следовательно, не всё продумано и предусмотрено в этой методике, но она уже запатентована.

2. В разделе " Материалы и методы исследований" необходимо чётко характеризовать реактивы и материалы, используемые в экспериментах, т.к. от этого зависит правильное понимание результатов эксперимента. Так при изучении скорости процесса адгезии фибробластов автор не указывает, какого качества были культуральные флаконы. В настоящее время многие ведущие фирмы выпускают культуральную посуду с поверхностью обработанной различными специальными веществами для лучшей адгезии разных видов клеток, поэтому в зависимости от того обработана посуда или не обработана и чем обработана результаты эксперимента по скорости адгезии клеток будут очень сильно отличаться.

Также необходимо указывать площадь рабочей поверхности культуральных флаконов и придерживаться *единой терминологии*. Не следует в одних случаях использовать термин "флакон", а в других "матрац", т.к. это совершенно разные объекты и процессы развития и адгезии клеток в них будут значительно отличаться.

При добавлении антибиотиков в среды автор указывает, что "добавляем 10 мкл антибиотиков (Пенициллин-стрептомицин, 100-кратный лиофилизированный, производство Пан-Эко, г. Москва), 5 мкл экстракта бычьей сыворотки (ЭБС)". Для того чтобы всем специалистам было понятно о чём идёт речь, необходимо количество добавленных в среду антибиотиков выражать в И.Е. или мг (как принято во всём мире). Ведь иностранные специалисты вряд ли знают про расфасовку антибиотиков фирмы Пан-Эко и, поэтому количество добавленных мл этого концентрата ни о чём не говорит. Также, вряд кому-либо будет понятно, что такое "5 мкл экстракта бычьей сыворотки" и, что такое "ультрачистая вода"? Это определение, не говорит ни о каких параметрах, которыми бы определялось качество этой воды. Всем специалистам известна "деионизированная вода с сопротивлением не ниже 18 МгОм", которая имеет чёткие определённые параметры и широко используется в клеточных и молекулярно-биологических технологиях.



3. Не совсем понятно, с какой целью автор постоянно использует термин "аутологичные дермальные фибробласты" при получении культуры клеток. Термин "аутологичные" обычно принято употреблять в исследованиях связанных с трансплантацией клеток, тканей и органов, чтобы показать происхождение трансплантируемых объектов "аутологичное" или "гетерологичное". В данной работе, на наш взгляд, этот термин является лишним.

4. При ссылке на других авторов следует придерживаться хронологического порядка. Первым должен цитироваться автор, который раньше установил то или иное явление и первым заявил об этом в публикациях. Автор диссертации пишет, что "живые клетки не проницаемы для красителей, а мёртвые проницаемы и окрашиваются (О. Смирнова, 2013)", но этот факт установила не О. Смирнова в 2013 году, а о нём известно уже более 100 лет.

5. В исследованиях по изучению оптической плотности ядер дермальных фибробластов разных видов животных автор получил результаты, в которых  $\pm m$  почти достигает величины  $M$  (Таблица 11 диссертации, табл.4 - автореферата). С высокой степенью вероятности можно утверждать, что такие значения  $\pm m$  обусловлены тем, что клетки, взятые для анализа плотности ядра, находились в разных фазах клеточного цикла, поэтому и содержание ДНК в них было разным и, соответственно, плотность ядер (в ед. яркости) была разной. Клетки, находившиеся в фазе  $S$  и, особенно, на границе фаз  $S/G2$  содержали почти в 2 раза больше ДНК, по сравнению с клетками, находившимися в фазе  $G1$ . Это и дало большие значения  $\pm m$ . Для получения **объективных данных** по плотности ядер в фибробластах различных видов животных необходимо синхронизировать клеточные циклы этих клеток и привести их в какую-нибудь одну фазу цикла. Путём воздействия цитостатических веществ (в любую фазу), или путём голодания (в фазу  $G0$ ), или путём получения 100% монослоя и создания контактного торможения (в фазу  $G1$ ).

6. В выводе 2 необходимо было указать время (96 час), за которое монослой достигал 88,7%. Без указания времени данный монослой (88,7%) воспринимается как неполноценный.

Приведенные замечания касаются только некоторых уточнений, а некоторые имеют дискуссионный характер и не снижают общей ценности работы.

С учётом вышеизложенного, считаю, что диссертационная работа Левченко В.М.. представляет собой законченное исследование актуальное для клеточных технологий и ветеринарной медицины.

Принимая во внимание актуальность темы, объем выполненных исследований, **научную новизну и практическую значимость** полученных результатов считаю, что работа **Левченко Владимира Михайловича "Сравнительная оценка морфофункциональных свойств фибробластов сельскохозяйственных животных"** отвечает требованиям «Положения о порядке присуждения учёных степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук по специальности 06.02.01. - диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных, а её автор заслуживает присуждения искомой степени.

Официальный оппонент  
доктор биологических наук, профессор  
зав. лабораторией клеточной и генной инженерии  
ФГБНУ ВНИИ физиологии,  
биохимии и питания животных

  
**Рябых Владимир Павлович**

Подпись **Рябых В.П.** заверяю:  
Нач. отдела кадров ВНИИФБиП

  
**Власова Инна Леонидовна**

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных». 249013, г. Боровск, Калужская область, пос. Институт, ВНИИФБиП, тел. 8-(495)996-34-15; 8-(48438)43026; факс. 8-(48438)42088; e-mail: [bifip@kaluga.ru](mailto:bifip@kaluga.ru)

13.06.2017 года