

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Е.С. Кипарисовой на диссертацию Черкашовой Эльвиры Андреевны на тему: «ВЛИЯНИЕ ВНУТРИВЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ЦЕРЕБРАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ОСТРОЙ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС ПО ДАННЫМ МРТ И ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 3.1.24 Неврология (медицинские науки) 3.3.3 Патологическая физиология (медико-биологические науки)

Актуальность темы исследования

За последнее десятилетие уровень острой цереброваскулярной патологии среди трудоспособного населения вырос более чем в четыре раза. Инсульты занимают одно из первых мест в летальности и инвалидизации населения в возрасте до 50 лет, опережая сердечно - сосудистые и онкологические заболевания. Последствия инсульта влекут за собой значительные проблемы в процессе возвращения больных к нормальному социальному функционированию (в семейной жизни, профессиональной деятельности, социальной адаптации). После перенесённого инсульта в 50-90% случаев сохраняется неврологическая симптоматика или формируются новые неврологические, психопатологические синдромы, которые приводят к полной (19-25%) или частичной (47-50%) утрате трудоспособности. Однако не в полной мере изучены особенности современной терапии заболевания. Несмотря на то, что в некоторых случаях инсульт по степени тяжести может быть расценен как «легкий», сочетание с основными факторами риска требует иного экспертного диагноза и более затретен по экономической составляющей при проведении реабилитационных мероприятий. Начало 2000 годов характеризуется не только увеличением числа ишемического инсульта, но и осложненным течением болезни, связанного с применением современной патогенетической терапией (тромболизис, тромбоэкстракция),

что значительно изменяет клиническую картину болезни и влияет на реабилитационный потенциал. Среди причин, влияющих на течение болезни, относится не только позднее обращение к специалистам, неадекватная маршрутизация пациента с инсультом, но и абсолютные, и относительные противопоказания для применения тромболизиса и тромбэкстракции. Увеличивается количество пациентов, особенно в молодом возрасте, имеющие в основе факторов риска инсульта аутоиммунные нарушения, хроническое тромбовоспаление при иммунном тромбозе, обусловленного перенесенной коронавирусной инфекцией.

В настоящее время продолжается дискуссия об особенностях патогенетической терапии, определение показаний для расширения «терапевтического окна» при проведении адекватного лечения, поиск новых препаратов, улучшающих нейропротективные свойства мозга и нейропластичность. Кроме того, патогенетическая терапия инсульта, более чем в 60% случаев, сопровождается побочными эффектами, которые могут стать причиной их отмены. Тактика ведения пациентов с инсультами в России определена утвержденными клиническими рекомендациями Минздрава России, которые предусматривают схемы терапии в зависимости от сроков инсульта, но недостаточно полно отражают этиопатогенетическую терапию при сочетании инсульта с наличием сопутствующих факторов риска, и не учитывают, в полной мере, синдромнопатологическую составляющую очаговой патологии головного мозга. Несмотря на значительные успехи в оказании медицинской помощи в остром периоде инсульта именно препаратов, расширяющих «терапевтическое окно» для улучшения нейропротекторных свойств, крайне ограничено. Терапия стволовыми клетками в будущем создаст предпосылки для повышения репаративных возможностей ткани мозга, обладая низкой иммуногенностью, противовоспалительным и иммуномодулирующим действием.

В последние годы активно разрабатываются новые направления терапии инсульта, в том числе путем трансплантации мезенхимальных

стволовых клеток (МСК), считающихся одним из наиболее перспективных. Мезенхимальные стволовые клетки - субпопуляция стромальных клеток, представленных во многих органах и тканях, но максимально в костном мозге, жировой ткани, фетальном материале, пуповинной крови, амниотической жидкости и плаценте, которые чаще всего являются их источниками для последующего клинического применения. Потенциальные эффекты терапии мезенхимальными стволовыми клетками при инсульте обусловлены их способностью продуцировать целый ряд биологически активных субстанций, обладающих противовоспалительными, антифиброзными, иммуносупрессивными и ангиогенными свойствами. Экспериментальные исследования по трансплантации аллогенных МСК мелким животным с моделированным ишемическим инсультом, доказали их эффективность и безопасность. Тем, не менее, многие вопросы, применения клеточных препаратов остаются нерешенными. К примеру, отсутствуют публикации о сравнительных исследованиях методов доставки стволовых клеток в мозг. Сравнительное исследование эффективности разных концентраций стволовых клеток и их типов; изучение безопасности и эффективности более высоких кумулятивных доз МСК у пациентов с инсультом, особенно с быстро прогрессирующим жизнеугрожающим течением, представляется весьма актуальным.

В настоящее время применяются новые современные методики с использованием новых технологий по дедифференцировке до состояния «стволовости» клеток с помощью специальной обработки, с последующей дифференцировкой до нейрональных прогениторных клеток. Такая технология позволяет усилить сродство клеточной терапии к нервной ткани. В отличие от предыдущих результатов данный тип клеток не обладает тератогенностью, что крайне важно для дальнейшего периода восстановления и стабилизации болезни. В литературе крайне мало данных о механизме действия этих клеток. Кроме того, не совсем ясно, что с патогенетической целью принесет именно эта клеточная терапия. Однако,

поскольку технология получения и обработки трансплантата достаточно новая, имеется ограниченное количество литературных данных об особенностях механизмов действия и сопоставления клинической эффективности данного типа клеток.

Реабилитацию пациентов с инсультом нельзя признать совершенным, поскольку частота рецидивов болезни, стойкая утрата и потеря трудоспособности наиболее часто связаны с поражением нервной системы, поэтому именно расширение терапевтических методов восстановления является наиболее значимым и перспективным направлением в лечении цереброваскулярной патологии. Перечисленные нерешенные вопросы в области клеточной терапии инсульта обуславливают актуальность представленного исследования на стадии эксперимента.

Цель исследования, поставленная автором, состоит в уточнении влияния внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на церебральные изменения при острой фокальной ишемии головного мозга у крыс. Основываясь на доказательной базе – проведение МРТ и гистологического исследования. В соответствии с поставленной целью, были определены и адекватные ей задачи исследования.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения, выводы и практические рекомендации основаны на дизайне исследования. Экспериментальная работа одобрена этическим комитетом ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России - протокол №114 от 30.01.2012 года, университетской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова – протокол №13/2020 от 08.10.2020 года и протокол №24/2021 от 10.12.2021 года. Апробация результатов диссертации прошла на заседании кафедры Неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики лечебного факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России №10 от 17.05.2022 года. Личный вклад автора состоит в

поиске и анализе научно - исследовательской литературы по проблематике диссертационной работы, разработке дизайна и организации методологических подходов к реализации исследования. Автор самостоятельно выполнил эксперимент в полном объеме, который заключался в выполнении оперативных вмешательств на лабораторных животных, проведении МР-исследований и поведенческих тестов. Также автор принимал участие в подготовке материала для гистологических исследований. При непосредственном участии автора производилась интерпретация данных, полученных на основании методов нейровизуализации и гистологии, а также статистическая обработка результатов экспериментальной работы, написание текста диссертационной работы, подготовка научных статей и докладов. Полученные данные были обработаны с использованием методов статистического анализа и компьютерной обработки (Microsoft Office 2019, IBM SPSS Statistics 23.0).

По результатам работы имеются акты внедрения в практику. Материалы диссертации докладывались на научно-практических конференциях, симпозиумах. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из которых 5 - в изданиях, рецензируемых ВАК, 3 научных статьи - в научных журналах, индексируемых в базе данных SCOPUS, а также 5 тезисов докладов на международных конференциях.

Достоверность и новизна исследования

Новизна исследований, изложенных диссертантом, заключается в том, что при экспериментальном изучении эффективности клеточной терапии уточнены наиболее оптимальные дозировки мезенхимальных стволовых клеток, улучшающие протективные свойства клеток головного мозга при моделировании острой фокальной церебральной ишемии у крыс. Проведены корреляционные оценки терапевтической эффективности различных доз индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и нейральных прогениторных клеток с уточнением оптимальных дозировок при использовании. Уточнены влияние мезенхимальных клеток на активность

глиальной реакции вещества головного мозга в острой фазе ишемического инсульта у крыс с уточнением локализации клеток в областях головного мозга, подтвержденных дополнительными методами исследования: МРТ, гистологией, иммуногистохимией. Детальный анализ эксперимента крайне необходим для доказательной базы программирования ситуации в условиях разработки лекарственной терапии у пациента при острой цереброваскулярной патологии. Полученные сведения, подтверждающие очаговое поражение головного мозга, позволяют на надеяться в будущем на научно обоснованную клеточную терапию как в острый, так и подострый период инсульта.

Теоретическая и практическая значимость и рекомендации по использованию результатов работы

Представленный диссертантом экспериментальный комплексный методический подход позволяет повысить точность в определении доз и способа введения препарата, а также предположить и уточнить механизм действия на глиальную ткань мозга клеточной мезенхимальной терапии.

Эксперимент с моделью острого ишемического инсульта у животных, проведенный исследователем, позволит создать новые предпосылки применения лекарственного препарата на основе клеточной терапии у человека. Основной акцент в работе направлен на расширение показаний использования препаратов в остром периоде ишемического инсульта, что позволило автору говорить о продолжении работы в направлении клинических испытаниях в будущем; что крайне важно для внедрения в практику для оказания помощи в остром периоде заболевания врачу - неврологу.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Выводы и рекомендации диссертации делаются на основании тщательно выполненного эксперимента. С последовательно проведенной работой по моделированию острого ишемического инсульта у животных

(крыс) с использованием современного нейровизуализационного, гистологического, иммуногистологического анализов, и применением адекватных методов статистики изученного материала. Дизайн исследования достаточно трудоемкий, и констатирует о четкости и фундаментальности проведенной работы. Группы сравнения при всех исследованиях были сопоставимы. Таким образом, полученные результаты представляются обоснованными и имеют большую научную и практическую значимость.

Полученные соискателем результаты могут быть использованы в целях дальнейшего расширения лекарственной терапии в остром периоде ишемического инсульта и тактики ведения пациентов в подостром периоде при проведении реабилитационных мероприятий.

Материалы исследования использованы в программе учебных занятий элективного курса «Современные клеточные технологии в биологии, медицине и нейрохимии» для студентов медико-биологического и иностранного факультетов ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Также полученные в ходе исследования данные использованы в научно - исследовательской работе отдела ультразвуковой и функциональной диагностики ФГБУ «ФЦМН» ФМБА России и в работе центра коллективного пользования "Медицинские и биотехнологические нанотехнологии" ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Оценка содержания и оформления диссертации

Оформление диссертации соответствует общепринятому стандарту. Введение содержит обоснование актуальности, цель и задачи исследования, сведения о научной новизне, практической значимости, внедрении, апробации результатов, структуре работы. Изложена на 155 машинописных страницах, содержит 2 таблицы, 46 рисунков; состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 234 источника, из них 214 - зарубежных.

Главы 1. «Обзор литературы» посвящена изложению информации об исторически сложившихся и современных взглядов на проблему, в которых входит описание и общие данные о мезенхимальных стволовых клетках.

Для купирования нарастания симптомов программируемой клеточной гибели (апоптоза) при инсульте необходима терапия, препятствующая дальнейшему повреждению ткани мозга, направленная на подавление воспаления, на восстановление микроциркуляции, поддержание целостности гематоэнцефалического барьера и повышение пластичности мозга. Одним из наиболее перспективных решений может стать терапия стволовыми клетками, уже показавшая свою эффективность на животных по данным ряда научных исследований.

В настоящее время в эксперименте использовали перепрограммированные нейральные и мезенхимальные стволовые клетки человека. Из нейральных стволовых клеток в ходе нейрогенеза образуются все типы клеток в головном мозге, что гипотетически делает их перспективным кандидатом для терапии инфаркта мозга. Кроме того, и нейральные и мезенхимальные стволовые клетки способны выделять различные вещества, стимулирующие регенерацию мозговой ткани. Подробно описываются источники получения мезенхимальных клеток и механизмы действия этих стволовых клеток. Получение мезенхимальных стволовых клеток не представляет особых сложностей, так как их можно легко выделить из плаценты и различных тканей взрослого человека. Но получение нейральных стволовых клеток может быть затруднительно. С выделением нейральных клеток напрямую из человеческого мозга связан ряд технических, юридических и этических сложностей, что ставит перед исследователями задачу разработки альтернативных методов их получения. В настоящий момент наиболее безопасным методом считается прямое перепрограммирование соматических клеток. Наблюдения показали, что, проходя через систему кровоснабжения головного мозга, большая часть

нейральных и мезенхимальных стволовых клеток накапливается вокруг зоны инфаркта мозга («ядра ишемии»), в субкортикальных участках и мозговом стволе. Трансплантированные клетки не задерживаются в ткани мозга более 3-х суток, однако позитивный терапевтический эффект исследователи наблюдали в течение 2-х недель после трансплантации. Действие стволовых клеток, вероятнее всего, осуществляется через так называемый «паракринный эффект» — процесс, в котором стволовые клетки выделяют факторы (преимущественно - факторы роста), которые действуют как сигналы для окружающих клеток, и заставляют их изменять свою активность, чтобы инициировать процесс регенерации. При этом восстановление функций мозга продолжается и после того, как введенные в организм стволовые клетки теряют свою активность, поскольку они выступают в роли катализатора, запуская целый ряд механизмов восстановления мозговой ткани. Описана дифференцировка их по типам воздействия: автором представлена трансдифференцировка мезенхимальных клеток. Доказывается влияние стволовых клеток на глию. Описываются иммуномодулирующие свойства клеточной терапии. Приводятся примеры трансплантации в эксперименте и клинической практике. Приведены различные экспериментальные модели современных способов введения стволовых клеток в церебральный кровоток. Описаны положительное и отрицательное воздействия клеточной терапии при цереброваскулярной патологии.

Следует отметить, что информация о современных представлениях в области, рассматриваемых диссертантом, специальных вопросов особенностей действия стволовых клеток помещена им в главах, посвященных его собственным исследованиям, и используется в дискуссии при обсуждении результатов.

В целом автор демонстрирует хорошее владение литературой по теме диссертации.

Глава 2. «Материал и методы» содержит сведения о лабораторных животных. Клеточной культуре. Подробно описывает протокол экспериментального исследования эффективности клеточной терапии на модели инфаркта головного мозга у крыс. Уточняет методику забора мезенхимальных клеток и нейрональных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных клеток, а также специальных методах обследования (вплоть до описания неврологического статуса у животных) и принципах статистической обработки цифрового материала.

Глава 3 посвящена результатам исследования и их обсуждению. По представленным автором материалам, внутривенная трансплантация мезенхимальных клеток, независимо от дозы, способствовала регрессу неврологического дефицита. Однако, отмечен дозозависимый эффект: введение 5×10^5 мезенхимальных клеток приводило к уменьшению выраженности неврологического дефицита, начиная с 14 суток, при этом длительность терапевтического эффекта не превышала 1 месяц после введения. При трансплантации 2×10^6 - более выраженный по восстановлению неврологический статус животных, начиная с 7-х суток после клеточной инфузии. Данная доза препарата обуславливала более активный процесс функционального восстановления крыс и по критериям эффективности была более значимой, чем введение мезенхимальных клеток меньшей дозы. Не обнаружено влияние на динамику изменения массы тела животных и объема очага инфаркта мозга по данным МРТ, а также на показатель выживаемости лабораторных животных с моделью инфаркта головного мозга. В последующих этапах протокола изучена и сопоставлена терапевтическая эффективность внутривенной трансплантации нейрональных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, в идентичных дозировках, что и мезенхимальные клетки - вне зависимости от дозы клеток, введение ИПСК-НПК значительно улучшает выживаемость лабораторных животных по сравнению с крысами без клеточной терапии. Также было показано, что клеточная терапия ИПСК-НПК

в дозе 2×10^6 клеток способствует восстановлению неврологического статуса животных с экспериментальным инфарктом головного мозга. Внутривенная трансплантация ИПСК-НПК в обеих дозировках не оказывала значимого влияния на динамику изменения массы тела животных, а также объема очага инфаркта мозга по данным МРТ.

Отсюда автор делает вывод, что не отмечалось значимого различия в выраженности влияния на регресс неврологического дефицита внутривенной трансплантации разных типов клеток.

Автором уточнены данные сопоставления МРТ и гистологического исследования: распределение меченных микрочастицами оксида железа МСК имеет диффузный характер – клетки визуализировались в обоих полушариях головного мозга. По данным МРТ большая доза стволовых клеток вызывала большее количество зон сниженного сигнала, соответствующих меченым клеткам. С течением времени наблюдалась частичная элиминация из вещества мозга. При проведении гистологического исследования образцов головного мозга спустя 2 часа, 24 часа и 7 суток после внутривенной трансплантации 5×10^5 клеток не было обнаружено меченых МСК. В то же время при дополнительном проведении гистологического исследования ткани паренхиматозных органов, через 2 и 24 часа после трансплантации клетки визуализировались в образцах ткани легких и печени. Спустя 2 часа после внутривенного введения 2×10^6 меченых МСК визуализировались единичные трансплантированные клетки в образцах головного мозга по данным гистологического метода исследования. При этом МСК также находились в препаратах паренхиматозных органов, в большем количестве в легких, и продолжали детектироваться в тканях через 24 часа после трансплантации.

При помощи иммуногистохимического исследования было показано тормозящее влияние внутривенной трансплантации МСК в дозе 2×10^6 клеток на активность глиальной реакции в полушарии инфаркта головного мозга по сравнению с животными, которым не была проведена клеточная терапия. На

7-е сутки после клеточной трансплантации отмечалось уменьшение выраженности экспрессии глиофибрилярного кислого белка в области коры перифокальной зоны полушария инфаркта головного мозга, что свидетельствует об уменьшении активности астроцитов, вызванной ишемией головного мозга.

Полученные в ходе исследования данные позволяют сделать вывод о том, что присутствие МСК в непосредственной близости от зоны ишемии, равно как и в вообще в поврежденном органе, не лежит в основе терапевтического действия клеток при внутривенной трансплантации крысам с моделью инфаркта головного мозга. Трансплантированные клетки оказывают действие на восстановление неврологических функций за счет паракринных механизмов, приводя к уменьшению неврологического дефицита лабораторных крыс с моделью экспериментального инфаркта головного мозга. Полученные в ходе научной работы результаты внесут вклад в понимание механизмов действия мезенхимальных стволовых клеток и послужат основой при разработке протоколов клинических исследований, посвященных клеточной терапии ишемического инсульта у людей.

Обсуждение результатов и сформулированные выводы не вызывают замечаний. Выводы и практические рекомендации вытекают из собственных исследований автора. В них отражены ответы на вопросы, поставленные в задачах исследования, представленных диссертантом.

В работе встречаются стилистические и грамматические дефекты.

В остальном замечаний не вызывает.

Текст изложен хорошо, иллюстрирован таблицами и рисунками, значительно иллюстрирован.

К изложенному материалу имеются вопросы

1. Чем ваше исследование отличается от исследования других авторов по паракринному эффекту стволовых клеток?
2. Есть ли зависимость между дозой мезенхимальных клеток и их концентрацией в крови?

3. Имелись ли юридические аспекты и как вы их решали при получении культуры мезенхимальных клеток?

4. Какие выводы можно сделать по предварительным срокам внедрения данной клеточной терапии в клинические протоколы лечения ишемического инсульта?

Оценка автореферата диссертации

Основные этапы выполнения и ключевые позиции содержания работы, а также выводы и практические рекомендации представлены в лаконичном автореферате.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Черкашовой Эльвиры Андреевны на тему: «ВЛИЯНИЕ ВНУТРИВЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ЦЕРЕБРАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ОСТРОЙ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС ПО ДАННЫМ МРТ И ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ», является полным отражением законченной научно-квалификационной работы, в которой содержится новое решение актуальной научной задачи - изучение влияния внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на церебральные изменения при острой фокальной ишемии головного мозга у крыс по данным МРТ и гистологического исследования. По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости соответствует требованиям пунктов п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением правительства российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 24.04.2016г. №335), предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. А ее автор заслуживает присуждения искомой степени по специальностям 3.1.24 неврология (медицинские науки) 3.3.3 патологическая физиология (медико-биологические науки).

Даю свое согласие на публикацию предоставленных в настоящем отзыве моих персональных данных на сайте ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова, а также их хранение и использование в целях, связанных с обеспечением процедуры предстоящей защиты и последующей отчетности о деятельности диссертационного совета.

Официальный оппонент -

доктор медицинских наук (3.1.24 – неврология)
профессор кафедры нервных болезней и
нейрореабилитации
Академии постдипломного образования
ФНКЦ ФМБА России
Заслуженный врач России

Кипарисова Елена Сергеевна

«18» 11 2022 г.

Подпись д.м.н., профессора Кипарисовой Е.С.
«заверяю»

Ученый секретарь Академии постдипломного образования
ФНКЦ ФМБА России
к.м.н.

Курзанцева Ольга Олеговна

«18» 11 2022 г.



Адрес организации 125371 г. Москва Волоколамское ш., 91,
Академия постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России
+7 (495) 617-10-50
E-mail^info@medprofedu.ru