

О Т З Ы В

официального оппонента члена-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора, директора Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Морозова Сергея Георгиевича на диссертационную работу 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 и 3.3.3 Патологическая физиология

Актуальность темы исследования

Ишемический инсульт занимает ведущее место в структуре смертности и инвалидизации среди взрослого населения развитых стран. В настоящее время только реперфузионная терапия, включающая тромболизис или тромбэкстракцию, признана достоверно эффективной. Целью тромболизиса и эндоваскулярной тромбэкстракции является устранение причины возникновения острого нарушения мозгового кровообращения, но клинический результат дает только их применение в пределах терапевтического окна – в острейшем периоде инсульта. Несмотря на эффективность, реперфузионная терапия имеет ряд противопоказаний, что является существенным ограничением ее применения в клинической практике. Разработка эффективных и относительно безопасных методов терапии ишемического инсульта, не столь ограниченных узкими сроками применения, представляется актуальной и современной задачей. Диссертация Эльвиры Андреевны Черкашовой посвящена поиску подходов к решению этой задачи.

В течение последних 20-30 лет на животных моделях, а в последние годы и в рамках клинических исследований активно изучается безопасность и эффективность терапии ишемии головного мозга стволовыми клетками. Получены убедительные данные о том, что одним из наиболее

перспективных в этом плане кандидатов являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК). В связи со сложностью физиологических процессов, происходящих в веществе головного мозга в условиях ишемии, успешный подход к терапии инсульта должен включать многофакторное воздействие на происходящие в мозге патологические изменения. Согласно результатам исследований, посвященных изучению клеточной терапии экспериментального инсульта, трансплантация МСК оказывает именно такое воздействие, включающее противовоспалительный эффект, иммуномодуляцию, повышение нейропластичности и активацию ангиогенеза. Однако, несмотря на длительное и интенсивное изучение применения МСК, остается ряд вопросов, на которые в научном сообществе нет однозначного ответа и которые требуют более глубокого исследования. В частности, нет единого мнения даже об основных механизмах действия МСК. Большинство исследователей признают роль паракринного воздействия МСК на организм реципиента, но остаются не до конца ясными особенности действия, а также места приложения секретиремых МСК биоактивных факторов. В этой связи большое значение имеет определение характера распределения клеток после трансплантации при помощи современных методов исследования, а также особенностей церебральных изменений в ответ на клеточную терапию МСК.

Несмотря на достаточно большое количество исследований, посвященных изучению терапевтической эффективности клеточной терапии с помощью МСК, не определен оптимальный способ трансплантации данного типа клеток, обеспечивающий эффективность терапии, но при этом не травматичный для реципиента, не дающий большого количества осложнений и технически простой. Именно таков внутривенный способ введения клеточного материала. К сожалению, до сих пор не определена оптимальная дозировка МСК для внутривенной трансплантации и ограничено количество исследований, посвященных сравнению эффективности применения различных концентраций МСК на модели

инфаркта головного мозга в рамках одного исследования. Проведенное Эльвирой Андреевной изучение особенностей действия МСК в зависимости от дозы клеток, а также углубленное исследование особенностей механизма действия внутривеннотрансплантированных клеток данного типа актуально и внесет весомый вклад в планирование исследований по изучению эффективности клеточной терапии пациентов, перенесших ишемический инсульт.

Относительно новым направлением в клеточной биологии стала разработка методики дедифференцировки зрелых соматических клеток при помощи вирусных векторов до состояния плюрипотентности с последующей дифференцировкой в клетки нужного типа. Изучению терапевтической эффективности репрограммированных клеток на моделях инфаркта головного мозга посвящено ограниченное количество научных работ, в связи с чем представляет особенный интерес проведенное Эльвирой Андреевной Черкашовой сравнение терапевтической эффективности этого типа клеток с действием наиболее активно изучаемых на протяжении десятилетий мезенхимальных стволовых клеток при соблюдении одинаковых условий и параметров клеточной трансплантации, в том числе при одном пути введения одинаковых доз клеточного материала.

Таким образом, диссертационная работа является актуальной и представляет научную ценность для развития современной неврологии и патологической физиологии.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Содержащиеся в диссертационной работе Эльвиры Андреевны Черкашовой научные положения, выводы и практические рекомендации основаны на результатах проведенного автором экспериментального исследования, включавшего в себя тщательный и грамотно выполненный анализ полученных данных. На модели экспериментального инфаркта

головного мозга у лабораторных крыс была оценена эффективность внутривенной трансплантации различных доз мезенхимальных стволовых клеток плаценты человека в условиях острой фокальной ишемии в бассейне средней мозговой артерии, в том числе в сравнении с эффективностью терапии сходной дозой нейрональных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных клеток. Согласно дизайну исследования, срок наблюдения составлял 60 суток. Результаты исследования получены на сертифицированном оборудовании. Особенности распределения МСК непосредственно в момент внутривенной трансплантации и после нее были изучены с использованием высокопольной магнитно-резонансной томографии с последующей верификацией результатов данными гистологического исследования. Было выполнено иммуногистохимическое исследование, позволившее оценить влияние внутривенной трансплантации МСК на активность глиальной реакции на ишемию в коре головного мозга ипсилатерального по отношению к инфаркту полушария. Количество материала (115 лабораторных крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга) достаточно для получения статистически достоверных результатов. Экспериментальная работа одобрена этическим комитетом ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России - протокол №114 от 30.01.2012 года, и 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. Сравнительный анализ и статистическая обработка полученных данных была произведена с использованием методов статистического анализа и компьютерной обработки (Microsoft Office 2019, IBM SPSS Statistics 23.0). Автор диссертационной работы непосредственно участвовал во всех этапах научноисследования, включая экспериментальную работу, статистический анализ и представление полученных результатов. Объем выполненного исследования позволил обосновать положения, выносимые на защиту, и

сформулировать выводы. Выводы вытекают из поставленных задач, и подтверждены полученными результатами исследования. Все вышесказанное позволяет заключить, что содержащиеся в диссертации научные положения, выводы и рекомендации обоснованы.

Достоверность и новизна исследования

Достоверность исследования не вызывает сомнения, так как оно было проведено с использованием современных надежных и информативных методов при личном участии Эльвиры Андреевны Черкашовой на всех этапах работы. Все требующие этого данные подвергнуты грамотной статистической обработке. Все основные результаты опубликованы в рецензируемых научных журналах, в том числе в журналах, входящих в 1-2 квартили.

Диссертантом получены новые, оригинальные данные о терапевтическом эффекте внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на течение острой фокальной ишемии головного мозга у крыс и зависимости эффекта от дозы. Новыми являются и данные о терапевтической эффективности внутривенной трансплантации нейрональных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных клеток, при экспериментальном инфаркте головного мозга. Впервые проведен сравнительный анализ терапевтической эффективности оптимальных дозировок разных типов стволовых/прогениторных клеток при внутривенной трансплантации крысам с экспериментальным инсультом. С помощью иммуногистохимии исследовано влияние мезенхимальных стволовых клеток на активность глиальной реакции вещества головного мозга вблизи очага инфаркта. При помощи МРТ получены новые данные о характере распределения мезенхимальных стволовых клеток в режиме реального времени, начиная с момента начала внутривенной трансплантации крысам, а при помощи МРТ и гистологического исследования получены

данные об особенностях распределения мезенхимальных стволовых клеток в структурах головного мозга с течением времени.

Теоретическая и практическая значимость и рекомендации по использованию результатов работы

Результаты работы по изучению активности глиальной реакции в головном мозге реципиента, а также характер распределения трансплантированных внутривенно клеток, позволили на основании научно-обоснованных данных уточнить особенности влияния мезенхимальных стволовых клеток на вызванные острой ишемией патогенетические изменения в мозге и вносят вклад в понимание механизмов терапевтического действия МСК. Представленная диссертантом комплексная оценка эффективности мезенхимальных стволовых клеток в клеточной терапии экспериментального инсульта, в том числе оценка зависимости эффекта клеточной трансплантации от дозы и определение оптимальной эффективной дозы клеток, будет использована при разработке клеточных препаратов для клинического использования.

Полнота изложения результатов диссертации в опубликованных работах

По результатам работы имеются акты внедрения в практику. Материалы диссертации докладывались на научно-практических конференциях. 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.

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертация построена по традиционному плану и изложена на 155 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 3х глав, отражающих результаты собственных исследований, а также из заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Библиографический указатель содержит 234 источника, в том числе 214 ссылок на иностранные публикации и 20 ссылок на работы, напечатанные в российских журналах. Диссертационная работа содержит 2 таблицы, иллюстрирована 46 рисунками.

В работе четко определена заявленная цель научного исследования – изучение влияния внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на церебральные изменения при острой фокальной ишемии головного мозга у крыс по данным МРТ и гистологического исследования.

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, заявлена цель и поставлены задачи исследования, описана научная новизна, практическая значимость, приведены 6 положений, выносимых на защиту, а также информация о внедрении, апробации результатов и структуре работы.

В главе 1 дана оценка современного состояния исследований по теме диссертации. Глава содержит полное описание общих свойств МСК, источников их получения и механизмов действия, способности к дифференцировке и транsdифференцировке. Приведены результаты доклинических и клинических исследований по изучению терапевтической эффективности и механизмов действия мезенхимальных стволовых клеток. В главе также содержится информация о путях получения, свойствах и направлениях использования индуцированных плюрипотентных клеток.

В главе 2 приведена характеристика изучаемых групп животных (самцы крыс линии Wistar, n=115) и описан дизайн исследования. Дана подробная характеристика исследуемых в диссертационной работе типов стволовых клеток, способов их введения, изложены методы оценки неврологических нарушений у экспериментальных животных, режимы МР-

исследования и техника гистологического анализа. В работе использованы современные методы исследования и статистические методы анализа данных, соответствующие цели и задачам исследования.

В главе 3 проведен анализ результатов исследования и их обсуждение. Согласно полученным в ходе исследования результатам, внутривенная трансплантация мезенхимальных клеток, независимо от дозы, способствовала регрессу неврологического дефицита у лабораторных животных с экспериментальным инфарктом головного мозга. При этом была выявлена зависимость эффекта клеточной терапии от дозы МСК. Была изучена терапевтическая эффективность внутривенной трансплантации нейрональных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК-НПК). Было продемонстрировано, что вне зависимости от дозы клеток, введение ИПСК-НПК значительно улучшает выживаемость лабораторных животных по сравнению с крысами без клеточной терапии, однако, только введение ИПСК-НПК в больших дозах приводит к значимому регрессу неврологического дефицита. При сравнении терапевтической эффективности внутривенной трансплантации МСК и ИПСК-НПК в дозе 2×10^6 не было выявлено различий во влиянии на функциональное восстановление лабораторных животных. При этом только клеточная терапия ИПСК-НПК приводила к улучшению показателя выживаемости крыс с моделью острой фокальной ишемии головного мозга. На основании сопоставления данных МРТ и гистологического исследования был определен характер распределения меченных микрочастицами оксида железа МСК после внутривенной трансплантации. С течением времени количество трансплантированных клеток уменьшалось, и к 24 часам клетки переставали детектироваться в головном мозге по данным МРТ, что было также подтверждено результатами гистологического исследования образцов головного мозга. При дополнительном исследовании образцов паренхиматозных органов большее количество клеток определялось в ткани

легких и продолжали визуализироваться через 24 часа после введения. Согласно результатам иммуногистохимического исследования, на 7-е сутки после внутривенной трансплантации МСК в дозе 2×10^6 клеток было показано уменьшение активности глиальной реакции в полушарии инфаркта головного мозга по сравнению с животными, которым не была проведена клеточная терапия.

По результатам данного исследования можно сделать заключение, что внутривенная трансплантация мезенхимальных стволовых клеток оказывает положительное терапевтическое действие на течение экспериментального инфаркта головного мозга. При этом эффект зависит от дозы трансплантированных клеток, но не зависит от количества клеток и длительности их нахождения вблизи очага инфаркта головного мозга. Полученные в ходе научной работы результаты и предложенные практические рекомендации внесут вклад в развитие современной патологической физиологии, а также в фундаментальной и клинической неврологии.

Таким образом, автором проведен большой объем исследований для достижения поставленной цели и задач. Обсуждение результатов и сформулированные выводы не вызывают замечаний. Выводы и практические рекомендации отражают ответы на вопросы, обозначенные в задачах исследования и вытекают из собственных исследований автора. Диссертация написана с соблюдением правил ГОСТа к рукописям и содержит все необходимые разделы. Работа производит хорошее впечатление, хорошо иллюстрирована и выполнена в соответствии с требованиями ВАК Минобрнауки РФ. В диссертации встречаются незначительные стилистические и грамматические дефекты, однако, это не снижает качества представленной работы и общей положительной оценки. В остальном существенных замечаний не имею.

Оценка автореферата диссертации

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

К изложенному материалу имеются вопросы:

1. Какой процент трансплантированных мезенхимальных стволовых клеток достигает головного мозга при внутривенном введении?
2. Что происходит с трансплантированными мезенхимальными стволовыми клетками в периферических органах, имеет ли накопление в них отношение к их механизму действия?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа 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», представленная на соискание ученой степени кандидата наук по специальностям 3.1.24 неврология (медицинские науки) 3.3.3 патологическая физиология (медико-биологические науки) является самостоятельно выполненной, завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной 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. Доказана эффективность клеточной терапии экспериментального инфаркта головного мозга мезенхимальными стволовыми клетками, а также определены особенности взаимодействия трансплантированных клеток с организмом реципиента, что позволяет углубить представления о механизмах действия исследуемого типа клеток. По своей актуальности, объему произведенных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертация полностью

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).

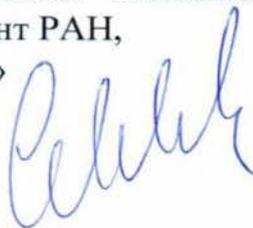
Даю свое согласие на публикацию предоставленных в настоящем отзыве моих персональных данных на сайте ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова, а также их хранение и использование в целях, связанных с обеспечением процедуры предстоящей защиты и последующей отчетности о деятельности диссертационного совета.

Официальный оппонент –

доктор медицинских наук (03.00.04 - Биохимия),
профессор, член-корреспондент РАН,
директор ФГБНУ «НИИОПП»

Морозов Сергей Георгиевич

«01» 12 2022 г.



Подпись д.м.н., профессора Морозова С.Г.

«заверяю»

ВРИО ученого секретаря ФГБНУ «НИИОПП»

к.м.н.

Кожевникова Елена Николаевна

«01» 12 2022 г.



Адрес организации 125315, Москва, ул. Балтийская, дом 8
ФГБНУ «НИИОПП»
+7 (499) 151-0421,
niiopp@mail.ru