

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 Наместниковой Дарьи Дмитриевны на тему: «Влияние внутриартериального и интрацеребрального введения мезенхимальных стволовых клеток на течение и исход острой фокальной ишемии головного мозга у крыс», 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 продолжает оставаться одной из актуальных проблем современной медицины. В настоящее время возможности лечения данной патологии все еще сильно ограничены. Внутривенное введение тромболитических препаратов и эндоваскулярная тромбоэкстракция являются единственными доказанными способами терапии острого ишемического инсульта, однако и они имеют ряд ограничений, среди которых ведущим является короткий временной интервал их применения. Высокие цифры заболеваемости, смертности, а также процент инвалидизации у пациентов, перенесших ишемический инсульт, ставят перед медико-биологической наукой вопрос о поиске новых методов лечения данной цереброваскулярной патологии. Особую актуальность представляет разработка терапевтических подходов, способных усилить процессы нейрорегенерации, улучшить микроциркуляцию, повысить нейропластичность, уменьшить нейровоспаление и апоптотическую гибель клеток в веществе головного мозга. В последние два десятилетия получено множество данных о том, что одним из таких подходов могут стать регенеративные клеточные технологии. Клеточная терапия с использованием мезенхимальных стволовых клеток показала свою высокую эффективность и безопасность в терапии экспериментального инфаркта головного мозга. Многочисленные доклинические исследования показали, что трансплантация

мезенхимальных стволовых клеток способна приводить к значимому уменьшению степени выраженности неврологического дефицита у экспериментальных животных и ускорять их восстановление после моделирования экспериментальной острой ишемии головного мозга. Безопасность и перспективность данного терапевтического подхода была также продемонстрирована и по данным первых клинических испытаний на пациентах с ишемическим инсультом. Для дальнейшего развития регенеративной клеточной терапии ишемического инсульта необходимо решить ряд вопросов, в том числе вопрос выбора наиболее эффективного способа трансплантации. Не до конца изученными остаются клеточные и молекулярные механизмы, благодаря которым мезенхимальные стволовые клетки оказывают свое положительное действие при острой ишемии головного мозга. Дополнительного изучения требуют также характер и механизмы распределения стволовых клеток в организме реципиента после трансплантации.

В связи со всем вышеуказанным, диссертационная работа Наместниковой Дарьи Дмитриевны, посвященная изучению влияния внутриартериального и интрацеребрального введения мезенхимальных стволовых клеток на течение и исход острой фокальной ишемии головного мозга у крыс, а также исследованию механизмов, лежащих в основе терапевтических эффектов клеточной трансплантации, является актуальной и имеет высокую научно-практическую значимость для патологической физиологии и неврологии.

Достоверность и научная новизна

Достоверность диссертационного исследования Наместниковой Дарьи Дмитриевны не вызывает сомнения. Научное исследование было проведено на большой выборке экспериментальных животных (238 самцов крыс линии Вистар), с использованием современных методов исследования, а также с применением адекватных методов статистической обработке данных при личном участии Наместниковой Дарьи Дмитриевны на всех этапах работы.

Диссертационное исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, а также университетской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных. Все основные результаты опубликованы в рецензируемых научных журналах.

В ходе диссертационного исследования Наместниковой Дарьи Дмитриевны был разработан инновационный метод неинвазивного интраоперационного магнитно-резонансного контроля за проведением операции по моделированию острой фокальной ишемии головного мозга методом эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии, использование которого позволяет значительно повысить эффективность моделирования экспериментального инфаркта мозга у лабораторных грызунов и улучшить качество проведения доклинических экспериментальных исследований. С использованием данного метода в ходе диссертационной работы были получены новые данные о терапевтической эффективности мезенхимальных стволовых клеток после их внутриартериального и интрацеребрального введения крысам с моделью острой фокальной ишемии мозга. Была доказана эффективность и безопасность трансплантации мезенхимальных стволовых клеток при указанных путях введения. В рамках исследования автором были получены новые данные о характере распределения и путях миграции трансплантированных мезенхимальных стволовых клеток в головном мозге крыс как в условиях острой фокальной ишемии, так и у интактных животных при внутриартериальном и интрацеребральном введении. В частности, проведение магнитно-резонансной томографии в режиме реального времени позволило получить новые данные о распределении мезенхимальных стволовых клеток непосредственно в момент и сразу после их внутриартериальной трансплантации. Диссертантом были также получены новые данные о механизмах, обеспечивающих неравномерное распределение трансплантированных клеток в головном мозге после их

внутриартериального введения: был продемонстрирован значимый вклад показателей церебральной перфузии, а также степени экспрессия генов молекул клеточной адгезии в веществе головного мозга. Впервые было показано, что после стереотаксического введения в стриатум трансплантированные клетки способны достигать мозолистого тела и передвигаться внутри него, а также накапливаться в периваскулярных зонах и передвигаться вдоль сосудов.

Теоретическая и практическая значимость и рекомендации по использованию результатов работы

Полученные в ходе проведенного диссертационного исследования данные о сопоставлении терапевтической эффективности мезенхимальных стволовых клеток после их внутриартериального и интрацеребрального введения крысам с моделью экспериментального инфаркта головного мозга, а также новые данные о характере и механизмах распределения клеток после трансплантации, могут быть использованы при разработке биомедицинских клеточных продуктов для лечения ишемического инсульта и при подготовке к клиническим испытаниям. Усовершенствование методики моделирования острой фокальной ишемии головного мозга методом эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии у крыс путем магнитно-резонансного контроля за внутрисосудистым положением филамента позволит повысить эффективность моделирования инфаркта мозга в доклинических исследованиях и внесет вклад в развитие экспериментальной неврологии и патологической физиологии. Таким образом, результаты проведенного исследования могут быть также рекомендованы для использования в работе образовательных медико-биологических учреждений и научно-исследовательских лабораторий. Полученные в ходе научной работы результаты внесут значимый вклад в развитие патологической физиологии и фундаментальной неврологии.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Содержащиеся в диссертационной работе Наместниковой Дарьи Дмитриевны научные положения, выводы и практические рекомендации основаны на результатах проведенного автором экспериментального исследования, включавшего в себя тщательный и грамотный анализ полученных данных. Достоверность представленных в диссертационной работе результатов не вызывает сомнений. Все исследования проведены на современном сертифицированном научном оборудовании, включая использование магнитно-резонансного томографа с индукцией поля 7 Тесла для экспериментальных животных, с верификацией результатов при помощи методов классической гистологии, иммуногистохимического исследования, а также с использованием методов молекулярной биологии. Объем выполненного исследования позволил обосновать положения, выносимые на защиту, и сформулировать выводы. Основные положения, выносимые на защиту, являются хорошо обоснованными и подкрепляются публикациями автора в научной печати, в том числе в международных журналах. Выводы четко вытекают из поставленных задач и подтверждены полученными результатами исследования. Все это позволяет сделать заключение о достоверности представленных в диссертационной работе Наместниковой Дарьи Дмитриевны результатов.

Полнота изложения результатов диссертации в опубликованных работах

Материалы диссертации были многократно доложены, обсуждены и одобрены на международных научно-практических конференциях. По теме диссертационной работы Наместниковой Дарьи Дмитриевны опубликована 31 печатная работа, из которых 4 статьи в рецензируемых изданиях из перечня ВАК, 9 статей в иностранных журналах, индексируемых в библиографической базе данных Scopus, а также 18 тезисов международных конференций.

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертация построена по традиционному плану и изложена на 196 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Библиографический указатель содержит 332 источника, в том числе 312 ссылок на иностранные публикации и 20 ссылок на работы, напечатанные в российских журналах. Диссертационная работа содержит 3 таблицы и иллюстрирована 43 рисунками.

В работе четко определена заявленная цель научного исследования – изучение влияния внутриартериального и интрацеребрального введения мезенхимальных стволовых клеток на течение и исход острой фокальной ишемии головного мозга у крыс. Для реализации поставленной цели четко сформулированы 6 последовательных задач исследования.

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, описана научная новизна, практическая значимость, приведены 7 положений, выносимых на защиту, а также изложена информация о внедрении и апробации результатов работы.

В главе 1 (в обзоре литературы) дана оценка современного состояния исследований по теме диссертации. Глава содержит подробный обзор существующих экспериментальных моделей острой ишемии головного мозга у лабораторных животных. Также в главе приведен анализ доклинических и клинических исследований, посвященных клеточной терапии ишемического инсульта. Приведены данные о различных механизмах действия стволовых клеток и о путях их трансплантации в экспериментальных исследованиях.

В главе 2 (материалы и методы) приведен подробный дизайн экспериментального исследования, направленный на последовательное решение поставленных в диссертационной работе задач. Приведена подробная характеристика лабораторных животных и используемой клеточной культуры. Изложена методика выполнения всех

микрохирургических манипуляций с лабораторными животными, техника выполнения анестезии, изложены методы оценки неврологического дефицита у экспериментальных животных, подробно описана методика выполнения магнитно-резонансного исследования, методы гистологического исследования и микроскопии. В работе использованы адекватные и современные методы статистического анализа полученных данных.

В главе 3 проведен анализ результатов исследования и их обсуждение. Подробно описан разработанный метод неинвазивного интраоперационного магнитно-резонансного контроля за внутрисосудистым положением филамента во время проведения эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии. Приведены четкие описания и расчеты, показывающие, что использование предложенного метода позволяет значительно повысить эффективность успешного моделирования экспериментального инфаркта мозга у крыс. Подробно описаны результаты комплексной оценки терапевтической эффективности внутриартериальной и интрацеребральной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток крысам с моделью острой фокальной ишемии, а именно приведен анализ выживаемости лабораторных животных, динамики изменения их веса, общего неврологического дефицита, моторной функции передней конечности, изменение объема очага инфаркта головного мозга. Подробно описаны и хорошо проиллюстрированы распределение и миграция трансплантированных стволовых клеток в головном мозге после интраартериального и интрацеребрального введения крысам с экспериментальным инфарктом мозга, а также здоровым животным. Приведено описание механизмов действия, обеспечивающих неравномерное распределение трансплантированных мезенхимальных стволовых клеток в головном мозге после их внутриартериального введения крысам с моделью острой фокальной ишемии, а именно оценен вклад церебральной перфузии и экспрессии генов молекул клеточной адгезии в различных областях головного мозга.

По результатам данного исследования можно сделать заключение, что трансплантация человеческих плацентарных МСК оказывает положительное терапевтическое действие как после внутриартериальной, так и после интрацеребральной трансплантации, однако эффективность внутриартериальной трансплантации более выраженная. В ходе диссертационного исследования получены новые данные о характере и механизмах распределения трансплантированных мезенхимальных стволовых клеток в головном мозге.

Таким образом, автором проведен достаточный 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 благоприятное впечатление, хорошо иллюстрирована и выполнена в соответствии требований ВАК Минобрнауки РФ. В диссертации встречаются незначительные стилистические и грамматические ошибки, однако, это не снижает качества представленной работы и общей положительной оценки. В остальном существенных замечаний не имею.

Оценка автореферата диссертации

Автореферат оформлен согласно рекомендациям ВАК, в нем отражены все этапы выполнения и ключевые позиции содержания работы, а также выводы и практические рекомендации.

К изложенному материалу имеются вопросы:

1. Какой из исследованных способов клеточной трансплантации может быть наиболее перспективен для применения в клинической практике у пациентов с острым ишемическим инсультом?

2. Могут ли мезенхимальные стволовые клетки проходить через структуры гемато-энцефалического барьера в случае ишемического инсульта?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Наместниковой Дарьи Дмитриевны на тему: «Влияние внутриартериального и интрацеребрального введения мезенхимальных стволовых клеток на течение и исход острой фокальной ишемии головного мозга у крыс», представленная на соискание ученой степени кандидата наук по специальностям 3.1.24 Неврология и 3.3.3 Патологическая физиология является самостоятельно выполненной, завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи - изучение влияния внутриартериального и интрацеребрального введения мезенхимальных стволовых клеток на течение и исход острой фокальной ишемии головного мозга у крыс. В работе проведена комплексная оценка и сопоставление терапевтической эффективности клеточной терапии мезенхимальными стволовыми клетками у крыс с моделью экспериментального инфаркта головного мозга при внутриартериальной и интравербальном способах клеточной трансплантации. В работе были также изучены потенциальные механизмы, обеспечивающие неравномерное распределение МСК в головном мозге. Был также предложен способ усовершенствования методики моделирования острой фокальной ишемии головного мозга методом эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии у крыс при помощи неинвазивного интраоперационного МРТ контроля за проведением операции, использованием которого позволяет повышает эффективность успешного моделирования экспериментальной фокальной ишемии у грызунов в доклинических исследованиях. По своей актуальности, объему произведенных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертация полностью 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, Наместникова Дарья Дмитриевна, заслуживает присуждения искомой степени по специальностям 3.1.24 Неврология и 3.3.3 Патологическая физиология.

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