

ОТЗЫВ

официального оппонента Баклашева Владимира Павловича, доктора медицинских наук, заместителя генерального директора по научной работе и медицинским технологиям ФГБУ ФНКЦ ФМБА России на диссертацию Измайлова Андрея Александровича на тему: «Влияние комбинации рекомбинантных ангиогенных факторов и нейрональной молекулы адгезии на патофизиологические аспекты морфо-функциональных изменений в спинном мозге крысы после моделирования контузионной травмы», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология.

Актуальность выполненного исследования. Проблема регенерации центральной нервной системы сохраняет свою актуальность со времен пионерских работ в этой области великого испанского врача и ученого Сантьяга Рамона-и-Кахаля. Особый интерес в изучении этой области представляет исследование посттравматической нейрорегенерации спинного мозга. Сегодня лечение пациентов со спинномозговой травмой включает в себя реабилитационные мероприятия, которые, к сожалению, не приводят к удовлетворительным клиническим исходам. Среди активно разрабатываемых стратегий лечения спинномозговой травмы наиболее перспективными представляются методы, в которых используются генные и клеточные технологии, которые с одной стороны направлены на сдерживание процессов воспаления, глиоза и нейродегенерации, а с другой – на стимулирование роста аксонов и установление утраченных нервных связей. Преодоление негативных посттравматических последствий требует фундаментальных знаний о патогенетических механизмах развития нейродегенерации. Следовательно, разработка методов регенеративной медицины неразрывно связана с глубоким изучением патологических процессов, происходящих в центральной нервной ткани после травматического повреждения.

Диссертационная работа Измайлова А.А. посвящена решению актуальной задачи патофизиологии – установлению механизмов морфо-функциональных нарушений у крысы с контузионной травмой спинного мозга, а также оценке эффективности интратекальной доставки в ЦНС

рекомбинантных генов сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), ангиогенина (ANG) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM), с помощью аденовирусных векторов и моноклеарных клеток крови пуповины человека на посттравматическую регенерацию спинного мозга. Немаловажно отметить, что диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 16-15-00010).

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. В диссертационном исследовании были использованы 34 крысы линии Вистар. Согласно цели и поставленным задачам эксперимента, животные разделены на 5 экспериментальных групп. Автор, реализовав хорошо спланированный эксперимент, на высоком методологическом уровне установил новые патогенетические механизмы посттравматической нейродегенерации спинного мозга. Автор обнаружил положительный эффект на восстановление спинного мозга после контузионной травмы, который оказали разработанные новые генные и генно-клеточные препараты. Используемые методы статистической обработки данных соответствуют характеру полученных результатов и были проведены с использованием базовых пакетов языка R. Все вышеизложенное определяет достоверность, обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертационной работе Измайлова А.А.

Новизна исследования и достоверность полученных результатов. В настоящем исследовании описаны новые патологические процессы, развивающиеся у крысы через 30 суток, прошедших после моделирования контузионной травмы спинного мозга. В своем исследовании Измайлов А.А., на фоне снижения произвольной и вынужденной двигательной активности у подопытных животных, обнаружил уменьшения объема движений в суставах задних конечностей, патологические изменения М- и Н-ответов *m. gastrocnemius*, при стимуляции седалищного нерва и магнитной стимуляции шейно-грудного отдела позвоночника, образование полостей в сером веществе мозга и снижение площади миелина в белом веществе, развитие астроглиоза, повышение экспрессии белка теплового шока Hsp27 и снижение экспрессии синаптических белков в нейронах.

Автором диссертационной работы впервые установлено, что интратекальное введение аденовирусных векторов, содержащих гены *vegfl65*, *ang* и *ncam1*, или моноклеарных клеток крови пуповины человека, экспрессирующие рекомбинантные VEGF, ANG и NCAM, улучшает двигательную активность у крыс, приближает электрофизиологические характеристики вызванных потенциалов скелетных мышц задних конечностей в ответ на магнитную стимуляцию спинного мозга и электрическую стимуляцию п. *ischiadicus* к интактным значениям, а также способствует положительному ремоделированию спинного мозга (лучшая сохранность серого и белого вещества спинного мозга, сдерживание астроглиоза, восстановление экспрессии синаптических белков).

Научная и практическая значимость диссертации. Результаты, полученные в ходе проведенного диссертационного исследования, о патофизиологических и патоморфологических изменениях в спинном мозге после контузионной травмы имеют важное фундаментальное значение. Новые данные о кинематике суставов, электромиографии скелетной мышцы, морфологических, клеточных и молекулярных изменениях в сером и белом веществе спинного мозга, дополняют картину патогенеза нейродегенеративных процессов в спинном мозге и создают платформу для поиска эффективных методов патогенетической терапии.

Практическую ценность представляют данные по изучению влияния разработанных автором генных и генно-клеточных препаратов на стимулирование посттравматической нейрорегенерации спинного мозга. Установленная эффективность рекомбинантных генов *vegfl65*, *ang* и *ncam1* открывает широкие перспективы в генной терапии не только спинномозговой травмы, но и других нейродегенеративных заболеваний.

Апробация результатов и внедрение проведенных исследований в практику. Материалы диссертации Измайлова А.А. представлены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях. Диссертантом опубликовано 16 печатных работ по теме диссертации, из них три статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных библиографических базах Scopus и WoS.

Основные положения диссертации могут быть рекомендованы для включения в лекционные курсы кафедр патологической физиологии, нормальной физиологии, патологической анатомии и нормальной анатомии для студентов и аспирантов медицинских факультетов. Разработки новых генных и генно-клеточных конструкций могут быть востребованы в научно-исследовательских лабораториях регенеративной медицины.

Оценка содержания работы, ее завершенность. Содержание и структура работы соответствует общепринятым требованиям, предъявляемым к диссертациям. Диссертация Измайлова А.А. изложена в традиционном стиле на 168 страницах текста. Диссертация включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы, две главы с результатами исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы и список сокращений. Работа иллюстрирована 12 таблицами и 36 рисунками. Библиографический список содержит 253 зарубежных источников и 10 отечественных.

В главе «Введение» автор обосновывает актуальность темы диссертационной работы, формулирует цель и конкретные задачи исследования. Научная новизна, практическая значимость и положение, выносимое на защиту, соответствуют представленным в диссертации материалам.

Обзор литературы состоит из 8 разделов, в которых автор исчерпывающе характеризует современное состояние изучаемой проблемы, акцентируя внимание на вопросах, связанных с патогенезом травмы спинного мозга и преодолением негативных посттравматических последствий. Начинается литературный обзор с подробного описания спинномозговой травмы и современном состоянии проблемы в России. Далее автор переходит к общей характеристике патологических изменений в нервной ткани в ответ на травму, представляет последние данные о факторах нейропластичности и методах регенеративной медицины (генная и клеточная терапия), которые стимулируют посттравматическое восстановление спинного мозга в экспериментах на животных. Обзор литературы завершается сведениями о доклинических и клинических испытаниях клеток крови пуповины человека для терапии травмы спинного мозга. Таким образом, диссертант

демонстрирует глубокое и разностороннее понимание патогенеза спинномозговой травмы и высокий уровень владения современным состоянием проблемы лечения травмы спинного мозга.

В главе «Материалы и методы» автор полноценно и понятно излагает дизайн исследования, дает подробное описание применяемых в работе экспериментальных протоколов вместе с оборудованием и реагентами. Подробно описано моделирование контузионной травмы спинного мозга, представлены протоколы поведенческих тестов, анализа кинематики суставов, электрофизиологических методов, которые включали электрическую стимуляцию *n. ischiadicus* и магнитную стимуляцию шейно-грудного отдела спинного мозга. В работе описаны гистологические методы исследования, а именно – морфометрический анализ сохранности серого вещества, площади миелина белого вещества, иммунофлуоресцентный анализ молекулярных и клеточных маркеров клеток спинного мозга. Подробно описан процесс получения генного и генно-клеточного препаратов, анализ эффективности трансдукции мононуклеарных клеток *in vitro* и *in vivo* и доставка рекомбинантных генов в спинной мозг. В полной мере отражены используемые методы статистического анализа. Все используемые автором методы современны и адекватны поставленным задачам.

Глава «Патофизиологические и патоморфологические изменения в спинном мозге крыс после моделирования контузионной травмы» содержит результаты комплексного анализа патогенеза контузионной травмы спинного мозга крысы. Представлены данные о снижении двигательной активности по результатам поведенческих тестов, уменьшению объема движений в суставах задних конечностей, изменениях в М- и Н-ответах, вызванных потенциалов при электрической стимуляции *n. ischiadicus* и магнитной стимуляции шейно-грудного отдела, снижении иммуноэкспрессии синаптических маркеров (Synaptophysin, PSD95), повышении количества клеток, экспрессирующих белок теплового шока Hsp27, количественных изменениях клеток макро- и микроглии. Автором в главе представлены данные о сохранности белого вещества в передних, боковых и задних канатиках в эпицентре повреждения и сохранности серого вещества ростральнее и каудальнее места травмы.

Глава «Доставка рекомбинантных генов, кодирующих *vegf*, *ang* и *ncam* в спинной мозг крысы после моделирования контузионной травмы» посвящена анализу экспрессии рекомбинантных генов *in vitro* и *in vivo* и влиянию рекомбинантных генов на морфо-функциональное посттравматическое восстановление спинного мозга. Диссертантом получены неоспоримые доказательства стимулирующего влияния *vegf*, *ang* и *ncam* на нейрорегенерацию. Так, установлено, что интратекальная доставка трансгенов в спинной мозг крысы после контузионной травмы, с помощью аденовирусных векторов или моноклеарных клеток крови пуповины человека, оказывает положительное влияние на восстановление двигательной активности у животных, увеличение объема движений в суставах задних конечностей, улучшение электрофизиологических показателей скелетной мышцы, сохранность серого и белого вещества спинного мозга, увеличение экспрессии синаптических белков и снижение экспрессии белка клеточного стресса, ремоделирование спинного мозга (сдерживание развития астроглиоза, увеличение количества предшественников олигодендроглиальных клеток).

В главе «Обсуждение результатов» автор суммирует результаты исследования в целом, сопоставляя патологические сдвиги после моделирования нейротравмы и положительные изменения на фоне доставки в ЦНС трансгенов, кодирующих VEGF, ANG, NCAM. Автор акцентирует внимание на сравнительном анализе доставки рекомбинантных генов на аденовирусных векторах и генетически-модифицированных клетках крови пуповины человека. В конце главы обращается внимание на более выраженный положительный эффект на посттравматическую регенерацию спинного мозга при интратекальной доставке *vegf*, *ang*, *ncam* с помощью моноклеарных клеток крови пуповины человека.

В конце исследования автор приводит краткое заключение и формулирует выводы, вытекающие из материалов исследования и отвечающие поставленным задачам.

Соответствие содержания автореферата основным идеям и выводам диссертации. Автореферат в полной мере отражает основные результаты работы и соответствует требованиям оформления.

Замечания и вопросы по диссертации

1. Во Введении (с.7) упоминается, что VEGF способствует восстановлению ГЭБ. Это не вполне корректно, потому что, активируя пролиферацию эндотелиоцитов, VEGF, наоборот, способствует их дедифференцировке и повышению сосудистой проницаемости, т.е. дестабилизации ГЭБ (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24458982/>, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29299985/> и др.). В обзоре, кстати, диссертант совершенно корректно пишет о влиянии VEGF на повышение сосудистой проницаемости (с.30).
2. В обзоре литературы (с. 39) сказано: «Эндогенные НСК взрослого человека представляют собой популяцию стволовых клеток, которые присутствуют в эпендимном слое». Это не вполне корректно. Взрослые НСК существуют не только в «эпендимном слое» (вероятно, имеются в виду клетки радиальной глии В1 субвентрикулярной зоны), но и в зубчатой извилине гиппокампа (субгранулярная зона).
3. Непонятен выбор диссертантом метиленового синего для окрашивания миелина. Этот метод негативной окраски не позволяет адекватно оценить демиелинизацию. Существует хорошо известный специфичный метод позитивной окраски миелина – окрашивание Luxol Fast Blue по Klüver и Barrera в модификации И.В. Викторова, который следовало применить для оценки белого вещества (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/80207/>).
4. Методическим недочётом работы является отсутствие прямого подтверждения экспрессии трансдуцированных генов (продукция белков VEGF, ANG, NCAM) в МККП in vitro методом иммуофлюоресценции или иммуноблота. Обнаружение мРНК с помощью ПЦР, а также подтверждение продукции GFP после трансдукции аналогичным вектором – косвенные методы.
5. На рисунке 22 были бы уместны контрольные срезы крыс с TCM, но без введения генотерапевтических препаратов, для подтверждения того, что экспрессия VEGF, ANG и NCAM не является эндогенной (что вполне возможно, поскольку крысиные гомологи этих белков присутствуют в спинном мозге).
6. На рисунке 23 не вполне понятно отсутствие продуктов терапевтических генов в цитоплазме (полная колокализация с ядерным HNA). Следует

пояснить, почему это так? В подписи к рисунку ошибка – свечение HNA красное, а не зелёное.

Перечисленные замечания не являются принципиальными и не влияют на общую научно-практическую значимость проведенного исследования.

Вопросы для общего обсуждения:

1. Какова итоговая эффективность трансдукции МККП аденовирусными векторами, несущими гены *vegfl65*, *ang* и *ncam1*?
2. На каком этапе лечения ПСМТ рационально применение генотерапии геном VEGF, и стоит ли проводить такую терапию в острейшем периоде (с учётом про-воспалительной активности VEGF и повышения сосудистой проницаемости в ответ на VEGF-сигналинг)?
3. В обзоре литературы описаны острая и хроническая стадии травмы спинного мозга у человека. Какой стадии соответствуют 30 сутки контузионной травмы у крысы?
4. Какие клетки в спинном мозге подвергаются трансдукции при интратекальной инфузии аденовирусных векторов, несущих рекомбинантные гены?
5. Каковы предполагаемые молекулярные механизмы редукции GFAP и тенденцию к редукции Iba1 позитивных клеток в зоне травмы после генной клеточной терапии?

Заключение. Таким образом, диссертационная работа Андрея Александровича Измайлова «Влияние комбинации рекомбинантных ангиогенных факторов и нейрональной молекулы адгезии на патофизиологические аспекты морфо-функциональных изменений в спинном мозге крысы после моделирования контузионной травмы», является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой медицинской биологии и генетики ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России Исламова Рустема Робертовича. В данной работе решена актуальная научная задача патофизиологии, которая заключается в комплексной оценке патофизиологических аспектов морфо-функциональных изменений в спинном мозге крысы после моделирования контузионной травмы, а также разработке способов их коррекции с помощью доставки в ЦНС рекомбинантных генов

сосудистого эндотелиального фактора роста, ангиогенина и нейрональной молекулы клеточной адгезии.

Диссертация Измайлова Андрея Александровича полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 11 сентября 2021 г. № 1539, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а автор – Измайлов Андрей Александрович – заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология.

Официальный оппонент,
доктор медицинских наук
(научная специальность
03.01.04 Биохимия, медицинские
науки), заместитель генерального
директора по научной работе и
медицинским технологиям ФГБУ
ФНКЦ ФМБА России

«29» 10 2021 г.

Баклаушев Владимир Павлович

Подпись доктора медицинских наук
Баклаушева Владимира Павловича
заверяю

Специалист по кадрам



115682, г. Москва, Ореховый б р, д. 28

Телефон: +7 (499) 725-44-40

e-mail: serpoff@gmail.com