

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента на диссертацию Измайлова Андрея Александровича «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 темы диссертации**

Диссертация Андрея Александровича Измайлова посвящена изучению новых механизмов контузионной травмы спинного мозга и разработке патогенетически обоснованной стратегии восстановления поврежденной ткани с использованием вектор-опосредованной или клеточной доставки препаратов с прорегенераторной активностью. Актуальность исследования определяется несколькими факторами: высокая медицинская и социально-экономическая значимость травматического повреждения спинного мозга, практически полное отсутствие эффективных методов репарации поврежденного отдела спинного мозга, малая изученность клеточно-молекулярных механизмов контузионной травмы спинного мозга, потребность в разработке новой стратегии лечения для достижения терапевтического эффекта.

Несмотря на то, что травматическое повреждение спинного мозга находится в фокусе исследований в области неврологии, нейрохирургии, нейрохимии, нейрофармакологии и нейрореабилитации на протяжении уже нескольких десятилетий, до сих пор многие аспекты патогенеза травмы и механизмов восстановления спинного мозга остаются мало изученными и противоречивыми. В этом контексте особого внимания заслуживает феномен посттравматической нейропластичности, сочетающий в себе синаптогенез, нейрогенез, неангиогенез, но механизмы развития каждого из этих процессов по-прежнему далеки от расшифровки. В сравнении с объемом данных, накопленным при изучении пластичности

головного мозга при ишемическом, травматическом повреждении или хронической нейродегенерации, существующие представления о реализации пластических механизмов в ткани спинного мозга весьма фрагментарны.

Помимо изучения новых клеточно-молекулярных механизмов травматического повреждения спинного мозга в своем исследовании А.А. Измайлов выбрал новый интересный подход к терапии спинно-мозговой травмы, основанный на применении современных методов интенсификации пластичности спинного мозга за счет увеличения экспрессии генов, кодирующих белки с пронеурогенным и проангиогенным эффектами непосредственно в зоне повреждения. Такая терапевтическая стратегия дополнительно сообщает работе актуальность, коль скоро подобные подходы диктуют и принципиально новые протоколы оценки эффективности и безопасности, разработка которых становится не менее важной задачей. Именно поэтому сравнительный анализ эффективности применения генного и генно-клеточного препаратов, доставка которых в очаг повреждения достигается вирусным вектором или трансфектированными клетками, соответственно, важен не только с точки зрения разработки терапевтической стратегии как таковой, но и с позиции обоснования наиболее безопасного способа применения аналогичных препаратов.

Таким образом, в работе А.А. Измайлова удачным образом сочетаются оригинальный взгляд на проблему, интересно сформулированная научная гипотеза, современный методологический уровень, новые подходы к терапии спинномозговой травмы, что сообщает работе несомненную актуальность.

### **Новизна проведенных исследований и полученных результатов**

А.А. Измайловым применен комплексный протокол оценки механизмов развития экспериментальной спинномозговой травмы

(гистологические, нейрофизиологические, поведенческие тесты) и анализа эффективности разработанных автором методов регенерации ткани и доставки соответствующих продуктов в зону повреждения. С использованием интересного экспериментального дизайна Андреем Александровичем получены результаты, обладающие научной новизной. В частности, впервые установлено, что запуску механизмов репаративной посттравматической пластичности может препятствовать aberrantная экспрессия белков, контролирующих процессы реактивного глиоза и синаптогенеза, что не позволяет рассчитывать на эффективное восстановление синаптической передачи и формирование функционально компетентных нейронов. На основании этих данных автором сделано справедливое и логичное предположение о том, что сдерживание нарастающей нейродегенерации должно быть ключевой задачей терапии спинномозговой травмы. Впервые установлено, что сопровождающий такие изменения неврологический дефицит может, по крайней мере, частично блокироваться повышением экспрессии сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF), ангиогенина (ANG) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM) непосредственно в зоне травматического повреждения. Вне зависимости от примененного протокола доставки соответствующих генетических конструкций в зону повреждения (прямая доставка с помощью аденовирусных векторов, использование трансфектированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека - МККП) развивается ремоделирование ткани спинного мозга, характеризующееся подавлением воспалительных механизмов и интенсификацией процессов нейропластичности, что соответствует интенсивности синтеза рекомбинантных молекул (VEGF, ANG и NCAM) в ткани. Примечательно, что выбор способа доставки базируется и на возможности получения дополнительного прорегенераторного эффекта за счет продукции МККП цитокинов и факторов роста. Автором впервые установлено, что экспрессия NCAM в

МККП необходима для улучшения их миграционной активности и повышения выживаемости в очаге нейродегенерации. Таким образом, автором успешно и патогенетически обоснованно применены мультипрофильные генный и генно-клеточный препараты, содержащие *vegf*, *ang*, *ncam1*, для обеспечения посттравматической регенерации ткани в спинном мозге.

В целом, автором убедительно показано, что адресная экспрессия рекомбинантных белков в спинном мозге при его травматическом повреждении способствует редуцированию неврологического дефицита, предотвращает прогрессирование нейродегенерации, препятствует развитию реактивного глиоза, способствует улучшению электрофизиологических характеристик ткани. Таким образом, новизна полученных результатов не вызывает сомнений.

### **Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций и заключений**

Обоснованность основных положений, выводов, сформулированных в работе, обусловлена следующими аспектами: 1) комплексный и грамотно выстроенный дизайн работы, сочетающий в себе много разнообразных и взаимодополняющих методов исследования, базирующийся на четко сформулированной научной гипотезе; 2) скрупулезная оценка структурных и функциональных нарушений в ткани спинного мозга в тесном сопряжении с анализом данных о проявлениях неврологической дисфункции, обусловленных этими нарушениями; 3) сравнительный анализ (в том числе на разных этапах выполнения протокола экспрессии) эффективности применения двух способов достижения гиперэкспрессии молекул с пронеурогенной и проангиогенной активностью в очаге повреждения; 4) использование достаточного количества экспериментальных животных и четкое выполнение процедур, связанных с моделированием травмы, валидацией модели, фенотипированием

животных; 5) применение стандартных протоколов; 6) обсуждение полученных результатов с привлечением большого спектра имеющих в литературе данных по проблематике работы; 7) использование широкого набора методов статистической обработки данных; 8) проведение независимой внешней экспертизы работы (проект поддержан РФФИ) и представление результатов на российских и международных научных форумах, в статьях, опубликованных в журналах, индексируемых в российских и международных базах данных.

В связи с этим полагаю, что положение, выносимое на защиту, выводы опираются на полученные результаты. Цель работы достигнута, задачи решены в полном объеме. Достоверность представленных данных не вызывает сомнений.

### **Значимость результатов, полученных в диссертации, для науки и практики**

Значимость результатов диссертации А.А. Измайлова для фундаментальной науки (патологическая физиология, нейробиология, молекулярная генетика и биология, биоинженерия) определяется тем, что в работе: 1) подтверждена гипотеза о приоритетности стратегии сдерживания нейродегенерации и возможности применения метода индукции экспрессии молекул с пронеурогенной и проангиогенной активностью для достижения регенеративного эффекта при экспериментальной травме спинного мозга; 2) проанализированы различные аспекты прогрессирования повреждения спинного мозга, связанные с нарушением механизмов посттравматической нейропластичности; 3) идентифицированы новые эффекты экспрессии NSAM в МККП, способствующие адресной миграции клеток в ткани спинного мозга; 4) продемонстрированы новые подходы к обеспечению направленной доставки генных и генно-клеточных продуктов в центральную нервную систему; 5) подтверждена гипотеза о тесном

сопряжении процессов нейрогенеза и ангиогенеза в центральной нервной системе; б) дополнены существующие представления о патогенезе спинальной травмы и посттравматической нейродегенерации.

Значимость результатов диссертации для практической деятельности (регенеративная медицина, нейрохирургия, неврология, нейрореабилитация) определяется тем, что они: 1) создают научную основу для развития новых протоколов генной терапии, в том числе в регенеративной неврологии; 2) дополняют и конкретизируют области и способы применения генных и генно-клеточных препаратов для достижения терапевтического эффекта.

С учетом этих аспектов, диссертация А.А. Измайлова, несомненно, имеет высокую теоретическую и практическую значимость.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Результаты диссертационной работы А.А. Измайлова могут быть рекомендованы к использованию в следующих областях: 1) молекулярная биология и генетика, биоинженерия, генная терапия – при создании и тестировании новых генетических конструкций и способов экспрессии рекомбинантных белков в тканях млекопитающих, при планировании и выполнении работ по оценке эффектов и безопасных режимов применения таких препаратов; 2) патофизиология, физиология – при разработке комплексных протоколов оценки пластических изменений в ткани центральной нервной системы; 3) нейробиология, нейрохимия – при поиске и использовании молекул-маркеров повреждения и восстановления ткани центральной нервной системы; 4) высшее профессиональное образование в области медицины, биологии. Все указанные направления могут быть реализованы в университетах, клинических и академических центрах Российской Федерации.

**Оценивая содержание диссертации в целом,** хочу отметить, что диссертация написана хорошим академическим языком, читается легко и с интересом. Работа изложена на 168 страницах машинописного текста, имеет классическую структуру, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, двух глав с описанием результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы.

Во введении к диссертации автором четко и логично сформулированы актуальность, цель, задачи, положение, выносимое на защиту, личный вклад автора, степень достоверности и апробации полученных результатов, теоретическая и практическая значимость выполненного исследования. Обзор литературы выполнен на высоком аналитическом уровне, автор демонстрирует широкий кругозор, отличное владение материалом, достаточно подробно описывает различные точки зрения на изучаемую проблему, а также опыт применения протоколов генной терапии в клинической практике. Относительным недостатком этой части работы следует считать отсутствие рисунков или схем, иллюстрирующих текущее состояние исследований в данной предметной области и/или наличие пробелов в понимании тех или иных механизмов патогенеза и восстановления ткани спинного мозга. Глава «Материалы и методы», напротив, достаточно хорошо иллюстрирована, подробно детализирует все использованные автором экспериментальные модели и протоколы. Две главы с описанием результатов исследования построены логично, изобилуют иллюстративным материалом, в этих разделах, а также в главе «Обсуждение» автором соблюден удачный баланс в изложении полученных данных и их оригинальной интерпретации. Очевидно, что А.А. Измайлов свободно ориентируется в тематике исследования, представляет себе достоинства и возможные недостатки или ограничения тестируемых способов индукции восстановления ткани. Вместе с тем, как в случае с «Обзором литературы», глава «Обсуждение» и

глава «Заключение» только бы выиграли от наличия 1-2 резюмирующих схем, актуализирующих находки автора в контексте новых аспектов патогенеза и терапии спинномозговой травмы.

В целом, анализ текста диссертации подтверждает то, что А.А. Измайлов является сложившимся исследователем с аналитическим взглядом на изучаемую проблему, который способен эффективно и нестандартно решать научную задачи.

Все полученные результаты полно представлены в научных профильных изданиях, а также на конференциях российского и международного уровней. Автореферат диссертации оформлен в соответствии с общепринятыми требованиями, соответствует ее содержанию и дает полное представление об основных положениях работы. Принципиальных замечаний по автореферату нет.

**При чтении работы возникли следующие замечания:** 1) на рис. 23 представлены результаты оценки экспрессии VEGF, ANG и NCAM в ткани спинного мозга, однако в подписи к рисунку речь идет об экспрессии VEGF, GDNF (?), NCAM; 2) в тексте встречаются опечатки, пунктуационные, грамматические и стилистические ошибки; 3) не понятно, почему аббревиатура ПТСМ, по версии автора, означает позвоночно-спинномозговую травму; 4) полагаю, что автореферат выиграл бы от присутствия иллюстраций в основной части, описывающей результаты работы; 5) в списке литературы мало работ последних 3-х лет, что удивительно, с учетом того, как активно развиваются исследования в области генной терапии и регенеративной медицины; 6) на основании полученных автором новых данных более логичным было бы наличие, как минимум, двух положений, выносимых на защиту, включая положение, описывающее принципиально новые находки в патогенезе aberrантной нейропластичности при спинно-мозговой травме; 7) удивляет отсутствие в

работе практических рекомендаций, хотя они прямо следуют из результатов исследования.

Вместе с тем, все указанные замечания не носят принципиального характера и не влияют на общее положительное впечатление от работы.

Предлагаю автору следующие **вопросы в формате научной дискуссии** по проблематике исследования:

- 1) Почему в качестве маркера жизнеспособности нейронов в очаге повреждения спинного мозга был выбран Hsp27? Аккумуляция Hsp27 не обязательно сопровождает явления клеточного стресса, но может быть зарегистрирована, например, при дифференцировке клеток в процессе развития нервной системы. Как, в таком случае, могут быть однозначно интерпретированы полученные автором данные?
- 2) Судя по микрофотографиям (например, рис.23), уровень экспрессии целевых молекул с пронеурогенной и проангиогенной активностью в зоне повреждения после прибытия в ткань генетически модифицированных МККП оставался низким. Как автор объясняет наличие очевидного терапевтического эффекта при такой незначительной экспрессии?
- 3) Очевидно, что присутствие в ткани МККП + Ad5-GFP позитивно влияет на объем движений в суставах (рис. 26), аналогичный эффект очевиден при анализе сохранности серого вещества (рис. 30) и белого вещества (рис. 31) спинного мозга. Каким образом могут быть интерпретированы эти результаты, с учетом отсутствия экспрессии в этих клетках VEGF, ANG, NCAM?
- 4) Насколько, по мнению автора, может быть стабильным и длительно сохраняющимся эффект от гиперэкспрессии молекул с пронеурогенной и проангиогенной активностью в ткани спинного мозга?

## Заключение

Считаю, что диссертация Измайлова Андрея Александровича «Влияние комбинации рекомбинантных ангиогенных факторов и нейрональной молекулы адгезии на патофизиологические аспекты морфо-функциональных изменений в спинном мозге крысы после моделирования контузионной травмы» полностью соответствует паспорту научной специальности 3.3.3. – «патологическая физиология»: п. 2 (изучение общих патогенетических механизмов развития заболеваний, типовых патологических процессов и реакций организма на воздействие патогенного фактора), п. 9 (изучение этиологии, патогенетических и саногенетических механизмов при заболеваниях конкретных органов и систем), п. 10 (разработка новых путей этиологической, патогенетической и саногенетической терапии с учетом взаимодействия терапевтических факторов с защитно-приспособительными механизмами организма).

Диссертация Измайлова Андрея Александровича «Влияние комбинации рекомбинантных ангиогенных факторов и нейрональной молекулы адгезии на патофизиологические аспекты морфо-функциональных изменений в спинном мозге крысы после моделирования контузионной травмы», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, содержащей решение важной научной задачи патологической физиологии – расшифровку механизмов повреждения и поиск новых способов восстановления ткани центральной нервной системы, вносящей таким образом значительный вклад в развитие представлений о патогенезе травмы и патогенетически обоснованной коррекции возникающих функциональных нарушений. По новизне, научной и практической ценности полученных результатов, перспективам их практического применения диссертация полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней»,

утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024 и от 01 октября 2018 г. № 1168 с изменениями от 26 мая 2020 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Измайлов Андрей Александрович - заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3 – «патологическая физиология».

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник и заведующий  
Лабораторией экспериментальной нейробиологии  
Отдела исследований мозга  
Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения «Научный центр неврологии»,  
доктор медицинских наук  
(3.3.3 – патологическая физиология),  
профессор

Алла Борисовна Салмина

Россия, 125367, г. Москва,  
Волоколамское шоссе, д.80,  
Тел. +7(495)9170999;  
E-mail: allasalmina@mail.ru

Подпись доктора медицинских наук, профессора Салминой А.Б. удостоверяю:

Учёный секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии», старший научный сотрудник, кандидат медицинских наук



Анна Николаевна Евдокименко

« 10 »  2021 г.