

ОТЗЫВ

официального оппонента Акулинина Виктора Александровича на диссертационную работу Давлеевой Марии Александровны «Механизмы посттравматической регенерации спинного мозга мини-свиньи в условиях инфузии генетически-модифицированного аутолейкоконцентрата», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология в диссертационный совет 21.2.012.02 при ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России

Актуальность темы исследования

Травма спинного мозга остается одной из наиболее тяжелых и социально значимых проблем современной медицины, приводящей к стойкой инвалидизации преимущественно молодой и трудоспособной части населения. Несмотря на совершенствование стандартов хирургической помощи, симптоматической поддержки и нейрореабилитации, существующие протоколы лечения не способны обеспечить восстановление утраченных неврологических функций, что обусловлено крайне ограниченным регенеративным потенциалом центральной нервной системы и сложностью патофизиологических процессов, происходящих в зоне повреждения.

С позиции патологической физиологии, ключевой мишенью для терапевтического воздействия является вторичное повреждение спинного мозга, которое развивается в посттравматическом периоде и представляет собой сложный каскад деструктивных молекулярных и клеточных реакций. Ишемия, эксайтотоксичность, окислительный стресс, нейровоспаление, апоптоз и реактивный астроглиоз приводят к прогрессирующей гибели нейронов и клеток глии. В связи с этим, поиск и разработка патогенетически обоснованных подходов, направленных на прерывание каскада вторичного повреждения спинного мозга, модуляцию нейровоспаления и стимуляцию посттравматической регенерации, являются приоритетной задачей современной патофизиологии и регенеративной медицины.

Диссертационное исследование Давлеевой М.А., направленное на изучение молекулярных и клеточных механизмов посттравматической регенерации спинного мозга на клинически релевантной модели контузионной травмы у мини-свиней в условиях инфузии генетически модифицированного аутолейкоконцентрата, обладает несомненной актуальностью. Исследование не только раскрывает новые патофизиологические аспекты вторичного повреждения нейронов и глиальных клеток, но и закладывает фундамент для внедрения инновационного, безопасного и экономически эффективного персонализированного генно-клеточного препарата в клиническую практику лечения травмы спинного мозга.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Научная новизна диссертационного исследования М.А. Давлеевой заключается в фундаментальном раскрытии молекулярных и клеточных механизмов посттравматической регенерации спинного мозга мини-свиней в условиях применения персонализированного генно-клеточного препарата (аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного рекомбинантными генами с нейротрофическим действием).

Впервые на модели контузионной травмы спинного мозга у мини-свиней доказан миграционный потенциал аутологичных лейкоцитов, трансдуцированных химерным аденовирусным вектором Ad5/F35, несущим репортерный ген зеленого флуоресцирующего белка GFP. Установлено, что после внутривенной инфузии генетически модифицированные лейкоциты целенаправленно мигрируют не только в очаг нейротравмы, преодолевая поврежденный гематоэнцефалический барьер, но и заселяют органы иммунной защиты, продолжая *in situ* продуцировать рекомбинантные белки.

Новыми являются полученные соискателем данные о патогенетическом действии комбинации рекомбинантных молекул: ген сосудистоэндотелиального фактора роста (VEGF165), глиального нейротрофического фактора (GDNF) и нейрональной молекулы клеточной

адгезии (NCAM-1) на ключевые звенья вторичного повреждения спинного мозга. Впервые показано, что однократное внутривенное введение аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, в острую фазу травмы оказывает выраженное нейропротекторное действие, проявляющееся в сдерживании апоптоза нейронов и уменьшении клеточного стресса в ростральном и каудальном сегментах, а также в лучшей структурной сохранности серого вещества в каудальном отделе спинного мозга.

С позиции патофизиологии нейровоспаления, особую научную ценность представляют данные о способности секретируемых лейкоцитами рекомбинантных терапевтических молекул модулировать реактивный астроглиоз. Автор впервые продемонстрировал, что применение генно-клеточного препарата приводит к нормализации распределения астроцитов и микроглии в задних рогах спинного мозга, что создает благоприятное микроокружение для посттравматической регенерации.

Впервые установлено положительное влияние генетически модифицированного лейкоконцентрата на процессы ремиелинизации, проявляющееся в увеличении количества позитивных олигодендроцитов в боковых канатиках выше и ниже эпицентра повреждения.

Теоретическая и практическая значимость результатов

Теоретическая значимость работы заключается в раскрытии механизмов посттравматической регенерации спинного мозга в условиях генно-клеточной терапии. Диссертантом экспериментально обоснованы паракринный и эндокринный пути реализации терапевтического эффекта рекомбинантных факторов VEGF165, GDNF и NCAM-1, секретируемых генетически модифицированными аутологичными лейкоцитами. Установлено, что VEGF165, GDNF и NCAM-1 сдерживают развитие негативных последствий вторичного повреждения спинного мозга и стимулируют процессы регенерации.

Практическая значимость диссертационного исследования определяется перспективой трансляции предложенного способа лечения спинальной травмы у свиньи с помощью аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного терапевтическими генами с нейротрофическим действием, в клиническую практику. Данная инновационная биотехнологическая платформа приготовления генно-клеточного препарата может быть использована для разработки способа персонализированной генной терапии *ex vivo* не только пациентов с травмой спинного мозга, но и для лечения ишемических инсультов головного мозга и дегенеративных заболеваний центральной нервной системы.

Степень достоверности и обоснованности научных положений и выводов

Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертационном исследовании М.А. Давлеевой, не вызывает сомнений и базируется на солидной методологической базе, тщательном планировании эксперимента и применении современных методов анализа. Стоит отметить, что исследование частично поддержано грантом РНФ № 16-15-00010 по теме: «Клеточно-опосредованная генная терапия в сочетании с электростимуляцией при травме спинного мозга».

Достоверность и обоснованность полученных результатов обеспечиваются, прежде всего, комплексным дизайном исследования. С позиции патологической физиологии особую ценность представляет то, что соискатель не ограничился констатацией факта морфологического восстановления, а провел глубокий анализ молекулярных и клеточных сдвигов при вторичном повреждении и в ходе посттравматической регенерации на фоне генно-клеточной терапии. Использование панели специфических маркеров для оценки апоптоза (Caspase3), клеточного стресса (Hsp27), реактивного астроглиоза и нейровоспаления (GFAP, Iba1), ремиелинизации (Olig2) и синаптической пластичности (синаптофизин,

PSD95) позволило автору объективно оценить механизмы посттравматической регенерации спинного мозга.

Дизайн эксперимента отличается логичной структурой и наличием необходимых контрольных групп (интактные животные, контроль с введением нативного лейкоконцентрата), что позволяет четко разграничить эффекты собственно травмы, влияния клеточного носителя и действия терапевтических трансгенов.

Фундаментальным обоснованием выводов и вытекающих научных положений служит выбор адекватной и клинически релевантной экспериментальной модели. Моделирование контузионной травмы спинного мозга на мини-свиньях, анатомо-физиологические особенности которых максимально приближены к человеческим, является «золотым стандартом» для трансляционных исследований в нейрохирургии и регенеративной медицине. Автор грамотно применил непараметрические методы статистики (тест Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна), что является верным подходом при работе с малыми выборками крупных лабораторных животных ($n = 3-4$ в группе). Представление данных в виде медиан и интерквартильных размахов исключает искажение результатов и подтверждает воспроизводимость эффектов. Все вместе придает сформулированным автором заключениям высокую степень доказательности проведенного диссертационного исследования.

Сформулированные в работе 4 вывода и 2 положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют заявленным цели и задачам исследования. В частности, положение о паракринном и эндокринном механизмах действия рекомбинантных факторов VEGF165, GDNF и NCAM-1 научно обосновано данными о направленной миграции генетически модифицированных лейкоцитов не только в эпицентр травмы, но и в органы иммунной защиты.

Таким образом, все научные положения и выводы диссертанта строго аргументированы, статистически подтверждены и базируются на данных, полученных с использованием современных молекулярно-генетических,

иммунофлуоресцентных и морфометрических методов исследования, что свидетельствует о высокой степени их обоснованности и достоверности.

Общая характеристика, структура и оформление работы

Диссертационная работа Марии Александровны Давлеевой изложена на 164 страницах машинописного текста и структурно состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и списка иллюстративного материала.

Во «Введении» соискатель убедительно обосновывает актуальность избранной темы, четко формулирует цель и задачи исследования, раскрывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, а также приводит положения, выносимые на защиту.

В первой главе («Литературный обзор») автор проводит глубокий критический анализ отечественной и зарубежной литературы, посвященной патофизиологическим механизмам травмы спинного мозга, методам ее экспериментального моделирования и современным способам терапии спинальной травмы. Особое внимание уделено перспективам применения клеточной и генной терапии.

Вторая глава («Материал и методы») детально описывает дизайн эксперимента, протоколы предоперационной подготовки и моделирования контузионной травмы спинного мозга у мини-свиней. Автор подробно и воспроизводимо раскрывает методику приготовления генно-клеточного препарата на основе аутологичного лейкоконцентрата, трансдуцированного химерными аденовирусными векторами, а также применяемые гистологические, иммунофлуоресцентные, молекулярно-генетические и статистические методы исследования.

В третьей и четвертой главах представлены результаты собственных исследований. В третьей главе охарактеризованы патофизиологические и патоморфологические изменения в спинном мозге мини-свиней в динамике посттравматического периода. Четвертая глава посвящена доказательству

эффективности трансдукции лейкоцитов, анализу их миграционного потенциала *in vivo* и комплексной оценке стимулирующего влияния генно-клеточного препарата на посттравматическую регенерацию нервной ткани.

В пятой главе («Обсуждение результатов») автор грамотно суммирует полученные данные, сопоставляя их с результатами мировых исследований, и обосновывает механизмы действия рекомбинантных факторов VEGF165, GDNF и NCAM-1 на посттравматическую регенерацию спинного мозга. В заключении подведены итоги работы, а сформулированные 4 вывода полностью соответствуют заявленным задачам и полученным результатам.

Работа иллюстрирована 26 рисунками и 5 таблицами, которые наглядно и качественно отражают полученные экспериментальные данные. Список литературы содержит 271 цитируемый источник, включая фундаментальные монографии и современные статьи из рецензируемых отечественных и международных баз данных.

Диссертация написана грамотным, академическим языком, отличается четкой логикой изложения, последовательностью аргументации и аккуратностью в оформлении.

Полнота изложения основных результатов диссертации

Полученные результаты диссертационного исследования получили достаточно полное отражение в научных публикациях. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 1 статья из перечня ВАК, 2 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных библиографических базах Scopus и WoS, а также имеется 2 патента.

Соответствие содержания автореферата основным идеям и выводам диссертации

Автореферат диссертационного исследования Давлеевой М.А. достаточно полно отражает основные результаты работы и полностью отвечает нормативным требованиям к оформлению.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе и форме её изложения нет. При прочтении возникло несколько вопросов:

1. В диссертационной работе оценивается эффективность однократного введения в остром периоде аутологичного лейкоконцентрата и оценка гистологического материала через 8 недель после ТСМ. Учитывая, что экспрессия трансгенов на аденовирусных векторах часто является транзистентной, чем обоснован выбор именно этой конечной точки?
2. В работе использовалась одна доза вирусных векторов ($MOI = 10$). Проводились ли пилотные эксперименты по подбору оптимальной множественности инфицирования или соотношения векторов для достижения максимального терапевтического эффекта без токсичности?
3. Анализ синаптофизина выявил значительное уменьшение иммунопозитивной площади как в РС, так и в КС спинного мозга контрольных животных по сравнению с интактной группой. Значительное уменьшение белка постсинаптической плотности в КС и отсутствие различий в РС выявлены у животных из контрольной группы по сравнению с интактными мини-свиньями. Как вы считаете почему у животных из контрольной группы экспрессия синаптофизина и белка постсинаптической плотности в каудальном сегменте была существенно ниже и даже отмечалось отсутствием различий, по сравнению с ростральным сегментом?
4. Почему сохранность аксонов выявленных с помощью βIII -тубулина оценивали в белом веществе бокового канатика из области ростральных и каудальных сегментов эпидуральных фрагментов спинного мозга, а не из ростральных и каудальных сегментов спинного мозга?
5. Почему при явном улучшении неврологического статуса и сохранности аксонов не было выявлено значимых различий в сохранности белого вещества (по данным морфометрии) между терапевтической и контрольной группами? Свидетельствует ли это о том, что

терапевтический эффект направлен в большей степени на нейропротекцию и восстановление функции нейронов серого вещества, а также на ремиелинизацию (Olig2), а не на предотвращение кавитации в белом веществе?

Заключение

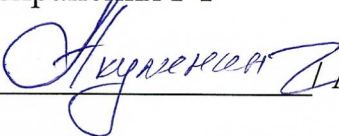
Диссертационная работа Давлеевой Марии Александровны «Механизмы посттравматической регенерации спинного мозга мини-свиньи в условиях инфузии генетически-модифицированного аутолейкоконцентрата», выполненная под научным руководством доктора медицинских наук, профессора Исламова Рустема Робертовича, является самостоятельной и законченной научной квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи – раскрытие молекулярных и клеточных механизмов посттравматической регенерации спинного мозга в условиях клеточно-опосредованной генной терапии с помощью аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного рекомбинантными генами с нейротрофическим действием, имеющей важное значение для патофизиологии и регенеративной медицины. Исследование выполнено автором самостоятельно, отличается высоким методическим уровнем, несомненной актуальностью и содержит новые научные данные, имеющие существенное теоретическое и практическое значение для патофизиологии и регенеративной медицины.

Учитывая актуальность избранной темы, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизну, диссертация Давлеевой М.А. «Механизмы посттравматической регенерации спинного мозга мини-свиньи в условиях инфузии генетически-модифицированного аутолейкоконцентрата» отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 «О порядке присуждения ученых степеней», в действующей редакции Постановления Правительства Российской

Федерации №1382 от 16 октября 2024 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а автор — Давлеева Мария Александровна — заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология.

Официальный оппонент:

Доктор медицинских наук (14.00.15 - патологическая анатомия, 03.00.25 - гистология, цитология, клеточная биология), профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ

 Акулинин Виктор Александрович

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
телефон: +7(3812) 957001
адрес электронной почты: rector@omsk-osma.ru
почтовый адрес: 644099, Омская область, г. Омск, ул. Ленина, д. 12

27 августа 2026 г.

