

## **«УТВЕРЖДАЮ»**

Проректор по научно-исследовательской  
работе федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения  
высшего образования «Ярославский  
государственный медицинский  
университет» Министерства  
здравоохранения  
Российской Федерации  
доктор медицинских наук, профессор  
Илья Николаевич Староверов



«26» августа 2026 г.

## **ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической значимости диссертационной работы Давлеевой Марии Александровны на тему: «Механизмы посттравматической регенерации спинного мозга мини-свиньи в условиях инфузии генетически-модифицированного аутолейкоконцентрата», представленной на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология

### **Актуальность темы диссертации**

Травма спинного мозга остается одной из наиболее тяжелых медико-социальных проблем современного здравоохранения, приводящей к стойкой утрате трудоспособности и глубокой инвалидизации пациентов преимущественно молодого и трудоспособного населения. Несмотря на стандартизацию хирургических и реабилитационных протоколов, существующие методы лечения носят преимущественно симптоматический характер. Они не способны предотвратить каскад вторичных патофизиологических реакций — ишемию, эксайтотоксичность, окислительный стресс, нейровоспаление, приводящих к прогрессирующей дегенерации нервной ткани, кавитации и формированию глиального рубца. В

связи с этим, поиск новых стратегий патогенетической терапии, направленных на коррекцию молекулярно-клеточных механизмов вторичного повреждения и стимулирование посттравматической регенерации, является актуальной задачей как в области патофизиологии, так и практической медицины.

С точки зрения коррекции патогенетических аспектов спинальной травмы особую ценность представляют подходы, обеспечивающие адресную доставку в область повреждения факторов, модулирующих нейропластичность. Клеточно-опосредованная (*ex vivo*) генная терапия позволяет решить проблему таргетной доставки терапевтических генов, минуя системные побочные эффекты и иммунные реакции, характерные для прямой (*in vivo*) генной терапии. Использование аутологичных лейкоцитов периферической крови в качестве клеточного носителя генов с нейротрофическим действием является перспективным, безопасным и доступным подходом, однако до клинических испытаний аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного терапевтическими генами, необходимо завершить фундаментальные исследования, в числе которых особое внимание уделяется механизмам действия генно-клеточного препарата на сдерживание развития негативных последствий вторичных повреждений и стимулирование посттравматической регенерации после спинальной травмы.

Вышеизложенное свидетельствует, что диссертационное исследование Давлеевой М.А., посвященное изучению механизмов посттравматической регенерации спинного мозга в условиях инфузии генетически-модифицированного аутолейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, несомненно, является актуальным, отвечает современным требованиям патофизиологии и обладает высокой научно-практической значимостью.

### **Новизна исследований и полученных результатов, выводов, сформулированных в диссертации**

Научная новизна диссертационного исследования Давлеевой М.А. не вызывает сомнений и заключается в получении новых фундаментальных и прикладных данных о молекулярно-клеточных механизмах вторичного повреждения и посттравматической регенерации спинного мозга в условиях клеточно-опосредованной генной терапии с помощью аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного комбинацией генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*.

Автором впервые на модели контузионной травмы спинного мозга у мини-свиней с использованием химерного аденовирусного вектора Ad5/F35-

GFP, несущего репортерный ген зеленого флуоресцирующего белка *gfp*, доказана направленная миграция генетически модифицированных аутологичных лейкоцитов из системного кровотока непосредственно в очаг нейротравмы и в органы иммунной защиты (селезенку), что обосновывает возможность реализации их терапевтического эффекта по паракринному и эндокринному механизмам. Диссертантом показано, что однократная внутривенная инфузия аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного комбинацией терапевтических генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, в острой фазе травмы оказывает выраженное патогенетическое действие на вторичное повреждение спинного мозга, проявляющееся в сохранности серого вещества каудальнее эпицентра повреждения и комплексном ремоделировании клеточного состава нейроглии. Установлены специфические молекулярно-клеточные сдвиги, лежащие в основе нейропротективного эффекта генно-клеточного препарата: сдерживание апоптоза (снижение количества Caspase3-позитивных клеток) и уменьшение выраженности клеточного стресса (снижение экспрессии Hsp27) с одновременным восстановлением синаптической активности (восстановление экспрессии синаптофизина) в отделах спинного мозга, прилегающих к эпицентру травмы. Также продемонстрировано положительное влияние рекомбинантных белковых молекул VEGF165, GDNF и NCAM1 на реактивный астроглиоз и нейровоспаление, проявляющееся в нормализации распределения астроцитов (снижение GFAP-позитивной площади) и клеток микроглии (снижение Iba1-позитивной площади) в задних рогах, а также увеличении пула миелинообразующих Olig2-позитивных олигодендроцитов в боковых канатиках роstralного и каудального отделов спинного мозга.

Принципиально новым является обоснование и экспериментальное подтверждение концепции персонализированной генной терапии *ex vivo* с использованием аутологичных лейкоцитов периферической крови в качестве безопасного и доступного клеточного носителя для доставки комбинации генов, кодирующих нейротрофические факторы. Доказано, что секреция рекомбинантных факторов мигрировавшими лейкоцитами непосредственно в зоне повреждения и в депонирующих органах позволяет эффективно модулировать каскад вторичных патофизиологических реакций (астроглиоз, нейровоспаление, апоптоз) и стимулировать структурно-функциональное восстановление спинного мозга.

## **Основное содержание диссертационной работы**

Диссертационная работа изложена на 164 страницах компьютерного текста и состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Работа иллюстрирована 26 рисунками и включает 5 таблиц. Библиографический список содержит 271 источник (русские и иностранные), что свидетельствует о детальном и всестороннем изучении автором исследуемой проблемы.

В разделе «Введение» диссертант обосновал актуальность выбранной темы, четко сформулировал цель и задачи исследования, отразил научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, а также сформулировал положения, выносимые на защиту.

В главе 1 «Литературный обзор» автором проведен критический анализ современных литературных данных, посвященных патофизиологии спинальной травмы. Подробно описаны каскады первичного и вторичного повреждения, роль клеток нейроглии в формировании глиального рубца и нейровоспаления. Диссертант обосновывает выбор модельных животных, останавливаясь на преимуществах использования мини-свиней для трансляции результатов в клинику. Также в главе представлен детальный обзор современных методов терапии спинномозговой травмы, факторов, влияющих на регенерацию нервной ткани (VEGF, GDNF, NCAM), и существующих стратегий генной и клеточной терапии, что служит теоретической базой для собственного исследования.

В главе 2 «Материал и методы» подробно и методологически грамотно описан дизайн эксперимента. Автор детально описывает протокол моделирования контузионной травмы спинного мозга в нижнегрудном отделе у мини-свиней, методы неврологического осмотра, методы гистологических исследований и морфометрического анализа. Особый интерес представляет описание оригинальной методики приготовления генно-клеточного препарата: получение аутологичного лейкоконцентрата и его трансдукция химерными аденовирусными векторами Ad5/F35 в закрытой гематологической системе, что исключает риски контаминации. Детально описаны методы иммунофлуоресцентного анализа с использованием панели маркеров (Hsp27, Caspase3, синаптофизин, PSD95, GFAP, Iba1, Olig2,  $\beta$ III-тубулин), а также подходы к статистической обработке данных. Следует отметить, что работа выполнена на высоком методическом уровне с применением современных молекулярно-генетических и морфологических технологий.

Глава 3 «Патофизиологические и патоморфологические изменения в спинном мозге после нейротравмы у мини-свиней» посвящена оценке патологических изменений в контрольной группе животных с введением нативного лейкоконцентрата после моделирования нейротравмы. Диссертант описывает формирование стойкого неврологического дефицита (параплегия, гипертонус, задержка мочи). С помощью морфометрического и иммунофлуоресцентного методов автор убедительно доказывает развитие вторичного повреждения: формирование кистозных полостей в сером веществе, развитие клеточного стресса (рост экспрессии Hsp27), усиление апоптоза (рост Caspase3-позитивных клеток), снижение синаптической активности, развитие выраженного реактивного астроглиоза и активации микроглии, а также гибель миелинообразующих олигодендроцитов.

В главе 4 автор детально излагает механизмы посттравматической регенерации спинного мозга в условиях клеточно-опосредованной генной терапии, которые состоят в эффективности трансдукции лейкоцитов *in vitro* (методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) и проточной цитометрии). Затем, с помощью репортерного гена *gfp*, доказывает направленный миграционный потенциал генетически модифицированных лейкоцитов из кровотока непосредственно в очаг нейротравмы и в органы иммунной защиты (селезенку) *in vivo*. Далее подробно описывает влияние инфузии лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncaml* на патогенетические аспекты вторичного повреждения спинного мозга после травмы. Установлено, что генно-клеточная терапия обеспечивает сохранность серого вещества, сдерживание апоптоза и клеточного стресса, целостность аксонов и восстановление синаптической активности, нормализацию распределения астроцитов и микроглии, а также сохранение пула олигодендроцитов.

В главе 5 «Обсуждение результатов» автор проводит сопоставительный анализ собственных данных с результатами отечественных и зарубежных исследователей. Диссертант аргументированно обосновывает механизм положительного действия препарата паракринным и эндокринным действием рекомбинантных белков VEGF165, GDNF и NCAM1, секретируемых генетически модифицированными лейкоцитами. Также обсуждаются преимущества использования химерного вектора Ad5/F35 и аутологических лейкоцитов как безопасного носителя для персонализированной терапии *ex vivo*.

На основе полученных результатов сформулировано заключение, обобщающее проведенное исследование, и выводы, которые логично вытекают из поставленных задач, полностью соответствуют цели работы и

научно обоснованы. Таким образом, структура диссертации последовательна, объем и характер представленного материала достаточны для решения поставленных задач и подтверждения заявленных положений. Автореферат отражает основное содержание диссертационной работы.

### **Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключения**

Достоверность и обоснованность научных положений, выводов и заключения диссертационной работы Давлеевой М.А. базируются на четком дизайне эксперимента, достаточном объеме исследования (14 половозрелых мини-свиней, разделенных на контрольную, терапевтическую, интактную группы и группу животных для оценки миграционного потенциала генетически модифицированных аутологичных лейкоцитов) и использовании релевантной модели контузионной травмы спинного мозга, максимально приближенной к клиническим условиям.

Диссертантом использован комплекс современных высокотехнологичных методов, адекватных поставленным задачам и отвечающих мировым стандартам патофизиологических и нейробиологических исследований. Применение молекулярно-генетических методов (ПЦР-РВ, проточная цитометрия), иммунофлуоресцентного анализа с использованием конфокальной микроскопии и широкой панели специфических антител к маркерам апоптоза, клеточного стресса, синаптической активности и клеткам нейроглии (астроцитам, олигодендроцитам, клеткам микроглии), а также классических гистологических и морфометрических подходов с программным анализом (ImageJ) позволило всесторонне и глубоко изучить механизмы вторичного повреждения и посттравматической регенерации нервной ткани в условия генно-клеточной терапии.

Полученный массив первичных данных подвергнут корректной статистической обработке с использованием современных программных продуктов (среда R, непараметрический тест Краскела — Уоллиса с апостериорным тестом Данна), что гарантирует объективность и воспроизводимость результатов.

Основные положения и результаты диссертационного исследования представлены на международных и всероссийских научных конференциях. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 2 патента на изобретения, 1 статья в журнале, входящем в перечень ВАК и 2 статьи в

рецензируемых изданиях, индексируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science.

### **Научно-практическая и теоретическая ценность полученных автором результатов**

Теоретическая ценность полученных результатов заключается в существенном расширении современных представлений о патофизиологии спинальной травмы и молекулярно-клеточных механизмах вторичного повреждения и посттравматической регенерации нервной ткани. Диссертантом впервые на модели у мини-свиней установлена направленная миграция генетически модифицированных аутологичных лейкоцитов из системного кровотока непосредственно в очаг нейротравмы и в органы иммунной защиты (селезенку). Это позволило выдвинуть гипотезу, что терапевтический эффект разработанного генно-клеточного препарата реализуется за счет паракринного и эндокринного действия рекомбинантных белков VEGF165, GDNF и NCAM1. Автором доказано, что данные факторы, секретируемые генетически модифицированными лейкоцитами в кровоток или *in situ* (в области нейротравмы), эффективно модулируют нейропластичность и сдерживают каскад вторичных повреждений, а именно увеличивают жизнеспособность клеток спинного мозга, нормализуют состояние клеток нейроглии, способствуют восстановлению синаптической активности нейронов. Эти данные вносят весомый вклад в фундаментальную патофизиологию, раскрывая новые пути коррекции посттравматической нейродегенерации.

Практическая ценность работы обусловлена разработкой и экспериментальным обоснованием безопасного, экономически доступного метода персонализированной клеточно-опосредованной генной терапии спинальной травмы. Важным практическим достижением является технология приготовления генно-клеточного препарата на основе аутологичного лейкоконцентрата с использованием химерных вирусных конструкций, несущих по отдельности три терапевтических гена, в закрытой гематологической системе. Данный подход исключает риски микробной контаминации генно-клеточного препарата, необходимость длительного культивирования клеток *in vitro* и использования антибиотиков или ксенобиологических компонентов, что критически важно для трансляции данной биотехнологии в практическую медицину.

## **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Материалы диссертационной работы успешно внедрены в учебный процесс кафедр общей патологии и кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России при подготовке студентов, аспирантов и ординаторов.

Разработанный способ получения и применения аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного терапевтическими генами *vegfl65*, *gdnf*, *pcam1*, может стать основой для разработки персонализированного генно-клеточного препарата для стимулирования посттравматической регенерации спинного мозга в клинической неврологии и нейрохирургии.

Результаты исследования рекомендуется использовать для дальнейшей разработки и внедрения в практическую медицину безопасного и экономичного подхода к персонализированной прецизионной генной терапии *ex vivo* на основе генетически модифицированных аутологичных лейкоцитов, выделенных из периферической крови пациента. Полученные данные являются перспективными для изучения и последующего применения метода клеточно-опосредованной генной терапии при травмах, ишемии спинного и головного мозга, в травматологии для стимулирования остео- и хондрогенеза, в кардиологии для ремоделирования миокарда.

## **Вопросы и замечания по диссертации**

В автореферате и тексте диссертации встречаются некоторые опечатки, несогласованные предложения. Принципиальных замечаний нет.

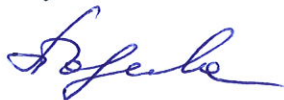
## **Заключение**

Диссертация 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 завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи патологической физиологии – раскрытие фундаментальных молекулярных и клеточных механизмов посттравматической регенерации спинного мозга после однократного внутривенного введения аутолейкоконцентрата, обогащенного рекомбинантными генами с нейротрофическим действием. По своей актуальности, научной новизне и практической значимости работа

соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, в действующей редакции постановления Правительства Российской Федерации №1382 от 16 октября 2024 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Автор работы, Давлеева Мария Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, протокол №1 от 26.08.2026 г.

Заведующий кафедрой патологической физиологии  
ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России,  
доктор медицинских наук, доцент



Порсева Валентина Вячеславовна

«26» августа 2026 г.

Подпись доктора медицинских наук, доцента Порсевой В.В. заверяю:

Ученый секретарь  
ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России,  
доктор медицинских наук, профессор



Мельникова Ирина Михайловна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, дом 5  
Тел: +7 (4852) 30-56-41  
Адрес электронной почты: [rector@ysmu.ru](mailto:rector@ysmu.ru)  
Официальный сайт: <https://ysmu.ru/>