

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Гарифулина Равиля Расимовича на тему: «Влияние аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом, на посттравматическую регенерацию спинного мозга у свиней», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология

Актуальность темы исследования

Травматические повреждения позвоночника и спинного мозга характеризуются высоким (от 57,5% до 96%) уровнем инвалидизации и социально-психологической дезадаптации вследствие утраты или ограничения способности к самостоятельному передвижению, самообслуживанию и полноценному общению. Более чем в 80% случаев позвоночно-спинномозговая травма встречается у людей трудоспособного возраста, и подавляющее большинство пострадавших остаются инвалидами на длительный срок, чаще на всю жизнь. Приблизительно в половине случаев инвалидность тяжёлая, I группы. Проблема усугубляется и высоким уровнем летальности. По разным данным от 16 до 36% пострадавших погибают до прибытия скорой медицинской помощи. Летальность в стационаре оценивается от 8 до 46-58%. Затраты на лечение, реабилитационные мероприятия и пожизненное содержание инвалидов представляют серьёзную экономическую проблему. Несмотря на значительный прогресс в понимании механизмов регенерации спинного мозга, общепринятые методы лечения пациентов с позвоночно-спинномозговыми травмами принципиально не меняются и носят в основном симптоматический характер: декомпрессионные операции, назначение антикоагулянтов, антибиотиков, миорелаксантов, противоотёчных, обезболивающих и нейропротекторных препаратов, лечебной физкультуры. Их главное назначение – предотвращение тяжёлых осложнений (мышечной атрофии, тромбозов, пролежней, пневмонии, инфекций мочевых путей и др.). Однако, они не решают главной проблемы – создание условий для регенерации повреждённых нейронов и их аксонов. Одним из перспективных направлений в лечении травм спинного мозга считается регенераторная или клеточная терапия. Однако, разновидности используемых клеток, среда для их доставки, спектр факторов роста, которые они могут выделять в повреждённый участок спинного мозга, остаются предметом научных дискуссий и продолжающихся экспериментов. В связи с этим, актуальность диссертационного исследования Р.Р.

Гарифулина, направленного на разработку и изучение эффективности нового генно-клеточного препарата для лечения травм спинного мозга, не вызывает никаких сомнений.

Научная новизна

Впервые предложен новый генно-клеточный препарат на основе аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного рекомбинантными генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, секретирующего факторы с нейротрофическим и ангиогенным действием для использования в остром посттравматическом периоде с целью улучшения условий регенерации повреждённого спинного мозга и сдерживания распространения вторичных повреждений в нижележащие сегменты. Это первый случай применения аутологичных лейкоцитов в контексте клеточной терапии. Согласно литературным сведениям для стимуляции регенераторных процессов в спинном мозге обычно используют различные типы стволовых клеток. Выбор лейкоцитов – очень интересное научное решение, т.к. они целенаправленно мигрируют к месту повреждения, следуя хемотаксическим сигналам, и, следовательно, могут быть идеальными доставщиками нейро- и ангиотрофических факторов. Более того, нейтрофилы и макрофаги способны самостоятельно синтезировать факторы роста. Следовательно, в работе использована естественная популяция клеток, способных продуцировать факторы роста и проангиогенные белки.

Впервые показано, что внутривенное введение аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного рекомбинантными генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, после спинномозговой травмы (СМТ) на уровне Th8-Th9 приводило к сдерживанию вторичных повреждений в поясничном отделе спинного мозга, оказывало превентивный эффект в отношении дегенеративных изменений нервно-мышечного аппарата и способствовало частичному восстановлению двигательной активности животных.

Изменения в отдалённом от эпицентра СМТ поясничном (L_{VI}-S_I) утолщении спинного мозга свиней изучены в комплексе с патоморфологией большеберцового нерва, образованного нервными волокнами этих сегментов, и камбаловидной мышцы, иннервируемой большеберцовым нервом.

Значимость для науки и практики

Представленная работа имеет несомненную научную и практическую значимость. Данные о морфофункциональных изменениях в отдалённых от первичной травмы сегментах спинного мозга в значительной степени расширяют представления о

патогенезе позвоночно-спинномозговой травмы, и могут быть использованы в нейростологии, нейрохирургии и травматологии. Следует отметить, что посттравматические альтерации в спинном мозге оценивались в комплексе с анализом структуры большеберцового нерва и иннервируемой им камбаловидной мышцы, что, бесспорно, повышает научную ценность исследования. Автором впервые представлен новый генно-клеточный препарат на основе лейкоконцентрата, обогащённого рекомбинантными генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, продемонстрировавший способность в определённой степени сдерживать распространение нейродегенеративных процессов в каудальном от спинномозговой травмы направлении. Он может быть взят за основу для дальнейшего усовершенствования, конечной целью которого будет разработка нового метода лечения позвоночно-спинномозговых травм у людей на основе их собственных лейкоцитов. В этой связи необходимо подчеркнуть, что в качестве объекта исследования автором использованы вислобрюхие свиньи, характеризующиеся структурно-функциональным сходством гистологических тканей и обладающие некоторыми общими механизмами работы белков и генов с человеком.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Представленные положения и выводы диссертационной работы грамотно обоснованы использованием современного комплексного методологического подхода, корректным статистическим анализом. Полученные данные проиллюстрированы микрофотографиями и диаграммами высокого качества. Результаты диссертационной работы опубликованы в 4 статьях, входящих в перечень ВАК и базы данных Scopus/Web of Science, неоднократно докладывались и обсуждались на научных конференциях. Получено два патента на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация имеет классическую структуру, состоит из введения, литературного обзора, описания материала и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, перспектив дальнейшей разработки темы, перечня сокращений и условных обозначений и списка литературы. Работа изложена на 142 страницах и включает 26 рисунков и 9 таблиц. Следует отметить грамотное и логичное изложение материала.

Во **введении** обоснована актуальность исследования, сформулированы цель и основные задачи работы, степень новизны полученных результатов и их апробация, отражен личный вклад автора.

В **первой главе** представлена классификация позвоночно-спинномозговых травм с оценкой нарушений чувствительности и двигательных функций в зависимости от степени тяжести и описанием сопутствующих морфологических изменений; рассмотрены имеющиеся в литературе данные о реакции различных типов глиальных клеток в острой, подострой и хронической фазах травмы спинного мозга (ТСМ); приведены немногочисленные и противоречивые сведения об изменениях в удалённых от эпицентра травмы сегментах спинного мозга, подтверждающие актуальность собственного исследования; описаны морфологические изменения периферических нервов и скелетных мышц, возникающие вследствие ТСМ; перечислены существующие методы лечения ТСМ с обоснованием перспективности генной терапии; подробно охарактеризованы нейротрофические факторы, которые потенциально способствуют регенерации при ТСМ, и генетические векторы, используемые для доставки терапевтических генов; указаны достоинства и недостатки различных типов стволовых клеток, применяемых в контексте регенеративной медицины.

Во **второй главе** представлен тщательно продуманный дизайн эксперимента, раскрыта методика приготовления аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного рекомбинантными генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, подробно описана экспериментальная процедура моделирования ТСМ, а также поведенческие тесты и электрофизиологические исследования. В работе использованы различные методики заливки материала и изготовления гистологических препаратов: заливка в парафин и заморозка в криостате для получения срезов поясничных утолщений и камбаловидной мышцы, заливка в полимерную смолу для полутонких срезов большеберцового нерва. Из рутинных гистологических красителей использовали гематоксилином и эозин, а также метиленовый синий. Визуализацию нейрон-специфичных, синаптических и глиальных белков-маркёров осуществляли с помощью иммуофлюоресцентных методов. Проведен тщательный морфометрический анализ. Статистическая обработка полученных результатов с использованием непараметрических тестов корректна.

В **третьей главе** приведены результаты эксперимента. Важным достоинством работы является логичная и хорошо проиллюстрированная форма представления полученных данных. Чёткое и понятное описание подтверждается таблицами,

превосходно выполненными микрофотографиями и диаграммами. Представлен клеточный состав лейкоконцентрата, в котором численно преобладали тромбоциты, лимфоциты и гранулоциты. Наглядно показана эффективность трансдукции лейкоцитов с демонстрацией наличия в них рекомбинантных молекул *vegf*, *gdnf* и *ncam1*. Рассмотрены результаты поведенческих тестов, продемонстрировавших небольшое, но статистически значимое увеличение двигательной активности у животных, получавших новый генно-клеточный препарат. При оценке состояния двигательных нейронов передних рогов отмечено снижение экспрессии ChAT и PSD95 в контрольной группе и повышение этих маркёров до уровня интактных животных в опытной группе. При этом отсутствовали изменения в типировании KCC2 и синаптофизина. Проведена количественная оценка иммунофлюоресцентной экспрессии маркёров глиальных клеток в передних и задних рогах спинного мозга. Установлено значительное снижение числа медленных волокон камбаловидной мышцы в контрольной группе. Представлены данные об уменьшении количества миелиновых нервных волокон на фоне увеличения их толщины в контрольной группе и нивелировании этих изменений в опытной группе, получавшей лейкоконцентрат с терапевтическими генами.

В четвёртой главе приведено патоморфологическое описание первичной СМТ и связанного с ней нейровоспаления, на фоне которого обосновывается необходимость доставки в повреждённый спинной мозг нейротрофических факторов. Представлены некоторые сведения об эффективности нового генно-клеточного препарата на основе аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного рекомбинантными генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, в отношении сегментов спинного мозга свиней, смежных эпицентру СМТ (Th₈-Th₉). Морфофункциональное состояние нейронов, синапсов и характер реорганизации нейроглии в смежных с травмой ростральных и каудальных сегментах сравниваются с таковыми в отдалённых пояснично-крестцовых. Приведены доказательства эффективности лейкоконцентрата с терапевтическими генами в отношении нейроглии, двигательных нейронов и синапсов, а также сохранности миелиновых нервных волокон большеберцового нерва.

В Заключении обоснованы: перспективность генно-клеточной терапии травм спинного мозга с указанием как положительных, так и отрицательных аргументов; необходимость изучения изменений в отдалённых от эпицентра травмы сегментах спинного мозга и эффективность предложенного автором генно-клеточного препарата в

отношении морфофункционального восстановления поясничного отдела спинного мозга у свиней после контузионной травмы в нижнегрудном отделе.

Выводы отражают суть диссертационной работы, логично вытекают из полученных автором результатов и соответствуют поставленным целям и задачам.

Автореферат соответствует содержанию диссертации. Публикации автора в достаточной степени отражают сущность диссертационного исследования.

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

1) Могла ли трансдукция вирусными векторами привести к увеличению естественной способности аутологичных нейтрофилов и моноцитов в лейкоконцентрате секретировать факторы роста? Какие разновидности лейкоцитов обогащались вирусными векторами лучше других, что могло повлиять на доставку нейро- и ангиотрофических генов в область повреждения?

2) В лейкоконцентрате, который Вы вводили животным, довольно высокая концентрация тромбоцитов. Рассматриваете ли Вы какие-либо положительные эффекты с их стороны на процессы регенерации после моделирования СМТ? Не наблюдались ли венозные тромбозы в качестве осложнения внутривенного введения лейкоконцентрата?

3) Т.к. как лейкоконцентрат вводился внутривенно, предусматривали ли Вы дополнительное воздействие на экспрессию молекул адгезии (например, E-селектин) на поверхности эндотелия, чтобы облегчить выход лейкоцитов из кровеносных сосудов? Какова степень повреждения кровеносных сосудов в области травмы? Может лейкоконцентрат накапливался в гематомах?

4) В литературе последних лет очень часто встречаются работы, в которых доставка терапевтических материалов (включая клетки) в повреждённый спинной мозг осуществляется с помощью инъекционных гидрогелей. В чём преимущество Вашей внутривенной формы введения лейкоконцентрата?

5) Оценка реакции нейронов, синапсов и глиальных клеток в Вашей работе изучалась с помощью иммуофлюоресцентных методов. Вы также отметили, что окрашивали парафиновые срезы поясничного утолщения спинного мозга гематоксилином и эозином. Обращали ли Вы внимание на изменения размеров и плотности расположения нейронов передних и задних рогов спинного мозга?

6) Вы изучали два маркера нейронов (ChAT и KCC2), но лишь один из них (ChAT) реагировал на травму и введение лейкоконцентрата с терапевтическими генами, и два

маркёра синапсов (PSD95 и синаптофизин), и снова только один из них (PSD95) продемонстрировал значимые изменения. В чём причина такого гетерогенного ответа? Почему KCC2 и синаптофизин существенно не менялись в ответ на травму и введение нового генно-клеточного препарата?

7) В задних рогах спинного мозга в контрольной группе отмечено повышение экспрессии GFAP, свидетельствующее о повышении активности астроцитов, и снижение этого маркёра после введения лейкоконцентрата с терапевтическими генами. При этом в передних рогах различий GFAP между контрольной и опытной группами не выявлено. В чём причина различной реакции астроцитов задних и передних рогов? Аналогично, почему в задних рогах спинного мозга новый генно-клеточный препарат оказал влияние на экспрессию Olig 2, а в передних нет? Непонятно, почему в опытной группе в задних рогах при более выраженном астроглиозе олигодендроциты восстанавливались почти до уровня интактных животных, а в передних рогах на фоне более низкой экспрессии GFAP, сравнимой с интактной группой, экспрессия Olig 2 почти такая же, как в контрольной группе, что приблизительно в два раза ниже значений интактных особей.

8) Маркёр микроглиальных клеток в передних и задних рогах спинного мозга через 2 месяца после СМТ был повышен как в контрольной, так и в опытной группах. Следует ли ожидать дальнейшего прогрессирования нейровоспаления, или это свидетельство перехода M1 в M2 фенотип микроглии?

9) Снижение доли медленных и увеличение доли быстрых волокон должно сказаться на характеристиках мышечного сокращения. Каким образом это проявилось в Вашем электрофизиологическом исследовании?

10) Как Вы думаете, можно ли рассматривать увеличение диаметра аксона и толщины миелиновой оболочки на фоне снижения числа миелиновых волокон в контрольной группе как проявление компенсаторно-приспособительной реакции?

Указанные вопросы и замечания не снижают значимости полученных результатов, не ставят под сомнение обоснованность основных положений и выводов и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Гарифулина Равиля Расимовича «Влияние аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом, на

посттравматическую регенерацию спинного мозга у свиней» является самостоятельной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научном уровне, в которой содержится решение актуальной задачи – разработке нового генно-клеточного препарата на основе аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf*, *ncam1*, и оценка его влияния на распространение вторичных повреждений спинного мозга после травмы. Диссертация соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утверждённого постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 1.5.22 Клеточная биология.

Официальный оппонент:

Доктор медицинских наук по специальности «03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология», доцент, профессор кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ишунина Татьяна Александровна

«20» апреля 2026 г.

Почтовый адрес: 305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3.

Телефон: 8 (4712) 58-13-72.

E-mail оппонента: IshuninaTA@kursksmu.net

Подпись д.м.н., доцента,
профессора кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии
Т.А. Ишуниной заверяю.

Начальник управления персоналом и
кадровой работы

Сорокина Наталья Николаевна

«20» апреля 2026 г.

