

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Зиматкина Сергея Михайловича на диссертацию Гарифулина Равиля Расимовича «Влияние аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом, на посттравматическую регенерацию спинного мозга у свиней», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология

Актуальность избранной темы

Поиск и разработка инновационных подходов к лечению позвоночно-спинномозговой травмы остается одной из приоритетных задач современной медицины. Травматическое повреждение спинного мозга представляет собой одно из наиболее тяжелых нарушений целостности структур центральной нервной системы (ЦНС), приводящее к необратимой потере двигательных и чувствительных функций, а также к высокому уровню инвалидизации у таких пациентов. Современные клинические протоколы терапии таких травм характеризуются низкой эффективностью, прямой зависимостью от времени начала лечения и направлены преимущественно на облегчение общего состояния пациентов.

Отягощающим фактором травматического повреждения спинного мозга является массовая гибель нервных клеток и невозможность восстановления структур спинного мозга из-за изначально ограниченного регенеративного потенциала ЦНС. Одной из современных концепций, используемых при терапии позвоночно-спинномозговой травмы является трансплантация генетически-модифицированных клеток, несущих гены ростовых и нейротрофических факторов. Эффекты нейротрофических факторов направлены на сдерживание развития нейровоспаления, дальнейшего распространения нейродегенерации с формированием астроглиальных рубцов с одной стороны, а с другой на стимуляцию роста отростков нейронов с формированием новой нейронной сети. Разработка таких методов для преодоления последствий травматического повреждения спинного мозга требует фундаментальных знаний о механизмах

развития и распространения процессов нейродегенерации не только в очаге травмы, но и в отдаленных от нее областях спинного мозга.

Диссертационная работа Гарифулина Р.Р. посвящена исследованию эффективности однократного внутривенного введения аутологичных лейкоцитов, секретирующих глиальный нейротрофический фактор (GDNF), сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и нейрональную молекулу клеточной адгезии (NCAM), на морфо-функциональное восстановление спинного мозга после его травмы. Следует подчеркнуть, что данное исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 16-15-00010).

Новизна полученных результатов

В рамках диссертационного исследования получены новые данные о клеточных механизмах распространения процессов нейродегенерации в поясничном отделе спинного мозга свиней после травмы в нижнегрудном отделе. Было обнаружено, что в этих условиях происходит снижение экспрессии в мотонейронах ключевого функционального белка-фермента холинацетилтрансферазы, снижение экспрессии синаптических белков, увеличение числа клеток астроглии (способствует образованию глиальных рубцов) и микроглии (фактор нейровоспаления), снижение количества миелинообразующих клеток в поясничном отделе спинного мозга, что соответствует формированию и распространению вторичных повреждений от эпицентра травмы.

Новыми являются данные о морфологических изменениях в нервно-мышечном аппарате у свиней после нейротравмы. Так в скелетных мышцах на фоне выраженной утраты двигательной активности, а также снижения мышечной массы у экспериментальных животных, автором было обнаружено уменьшение площади поперечного сечения мышечных волокон и нарушение их фенотипа (уменьшение доли медленных мышечных волокон). Исследование периферических нервов у таких животных выявило нарушение целостности нервных волокон на фоне снижения их количества, что согласуется с негативными изменениями, обнаруженными в скелетных мышцах и свидетельствует о возможной утрате нейротрофического контроля мышц со стороны двигательных нейронов поясничного отдела спинного мозга.

Автором впервые разработан инновационный генно-клеточный препарат с нейропротекторным действием на основе аутологичных лейкоцитов свиньи, экспрессирующего гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*. В диссертационной работе впервые продемонстрировано, что внутривенное введение аутологичного лейкоцонцентра, содержащего гены *vegfl65*, *gdnf*, и *ncam1*, улучшает двигательную активность у свиней, способствует увеличению экспрессии синаптических белков и положительному ремоделированию клеток нейроглии в отдаленном от эпицентра нейротравмы поясничном отделе спинного мозга. Сохранность нервно-мышечного аппарата у свиней также свидетельствует о позитивном влиянии аутологичного лейкоконцентра, обогащенного генетическим материалом, на посттравматическую регенерацию структур спинного мозга после его травмы.

Научная и практическая значимость диссертации

Представленное комплексное (поведенческое, электрофизиологическое, гистологическое, иммуногистохимическое исследование, как спинного мозга, так и связанного с ним нервно-мышечного аппарата) вносит существенный вклад в раскрытие патогенеза вторичных повреждений спинного мозга, выявляя ранее не изученные аспекты нейродегенеративных изменений в областях, удалённых от первичной травмы. Полученные данные о негативных морфофункциональных изменениях в поясничном отделе спинного мозга и нервно-мышечном аппарате свиней обладают практической значимостью как для установления направленности распространения вторичных повреждений спинного мозга, так и для оценки терапевтической эффективности применяемых методов лечения.

Особую ценность представляет проведение исследования на крупных лабораторных животных (свиньях), что значительно повышает научную значимость работы Р.Р. Гарифуллина.

Практическую значимость имеют данные об эффективности применения аутологичного лейкоконцентра, обогащённого генетическим материалом, для лечения травмы спинного мозга. Сведения о методах приготовления и применения указанной генно-клеточной конструкции, направленной на сдерживание вторичных повреждений спинного мозга, могут быть положены в основу разработки

персонализированного генно-клеточного препарата на основе собственных лейкоцитов пациента и генов с нейротрофическим действием.

Степень достоверности и обоснованности результатов работы, положения и выводов

Достоверность и обоснованность научных выводов и положения, выносимого на защиту не вызывают сомнений. Исследование выполнено с применением современных методов гистологического, иммуногистохимического и электрофизиологического анализа на крупных лабораторных животных. Комплексный подход исследования позволил выявить причинно-следственные связи между структурными повреждениями и функциональными нарушениями спинного мозга.

В исследовании была обеспечена достаточная выборка экспериментальных данных и применены обоснованные методы статистического анализа с использованием специализированного программного обеспечения. В работе прослеживается последовательная интерпретация полученных результатов, четкое соответствие между поставленными задачами, применяемыми методами и сделанными выводами. Сформулированные выводы логически вытекают из полученных соискателем данных и подтверждены статистически значимыми результатами.

Общая характеристика, структура и оформление работы

Диссертация Гарифулина Р.Р. изложена на 142 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материал и методы, результаты собственного исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, список литературы. Диссертация проиллюстрирована 26 рисунками и 9 таблицами.

Во введении автором детально раскрыта актуальность исследования, сформулированы цель и задачи, представлены научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, описаны методология и основное положение, выносимое на защиту.

Глава «Обзор литературы» начинается с описания спинномозговой травмы, ее степени тяжести, распространенности и наиболее частых причинах ее возникновения. Далее автор дает характеристику первичной и вторичной травмам спинного мозга с детальным описанием молекулярных и клеточных изменений. В обзоре литературы автор подчеркивает важность морфо-функциональных изменений нервной ткани в удаленной от травмы области, а также изменений в периферических нервах и скелетных мышцах в этих условиях. Особое внимание автор уделяет характеристике существующих методов терапии спинномозговой травмы (хирургическая декомпрессия, поддержание артериального давлений), а также современным методам регенеративной медицины, таких как генная и клеточная терапии, которые стимулируют посттравматическое восстановление спинного мозга в экспериментах на животных. Автор отмечает, что несмотря на перспективность их эффективность пока не нашла подтверждение при клинических исследованиях.

Автор в главе «Материал и методы» подробно излагает дизайн эксперимента, описывает протоколы применяемых методов исследования с оборудованием и реагентами. В каждом разделе представлены таблицы с описанием используемых реагентов. Детально изложена методика получения лейкоконцентрата, его трансдукция и оценка эффективности трансдукции с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания.

В работе описаны протоколы работы с экспериментальными животными, включая подробное описание хирургических манипуляций по моделированию нейротравмы, оценки двигательной активности и электрофизиологических исследований. Подробно описан забор и обработка биологического материала, изготовление гистологических препаратов, гистологические методы исследования и морфометрический анализ. Следует отметить полное соответствие выбранных методов исследования поставленным автором цели и задачам.

В главе «Результаты собственного исследования» представлены результаты доказательства эффективности трансдукции лейкоконцентрата и комплексного анализа морфофункциональных изменений в поясничном отделе спинного мозга и в нервно-мышечном аппарате у свиней с контузионной травмой спинного мозга в

нижнегрудном отделе. Автором подробно описаны результаты оценки эффективности аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом, на посттравматическую регенерацию спинного мозга у свиней, а также сохранность нервно-мышечного аппарата.

Диссертантом получены неоспоримые доказательства стимулирующего влияния продуктов экспрессии комбинации генов *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* на посттравматическую регенерацию спинного мозга. Показано, что внутривенное введение аутологичных лейкоцитов, экспрессирующих гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, способствует лучшему восстановлению двигательной активности, увеличению экспрессии синаптических белков, снижению реактивной нейроглии, увеличению количества олигодендроцитов.

В главе «Обсуждение результатов» хорошо сопоставлены между собой результаты собственного исследования, а также данные литературы.

«Заключение» содержит обобщение результатов исследования. Выводы работы четко аргументированы, соответствуют решаемым задачам и основаны на полученных данных. Диссертация написана грамотно, отличается ясностью и доступностью научного стиля, а также аккуратным оформлением.

Полнота изложения основных результатов диссертации

Результаты диссертационного исследования получили достаточно полное отражение в научных публикациях. По теме работы автором опубликовано 14 печатных работ, включая 4 статьи в рецензируемых журналах, включенных в международные базы данных Scopus и Web of Science. Важным подтверждением новизны и значимости исследования являются 2 патента Российской Федерации на изобретение.

Соответствие содержания автореферата основным идеям и выводам диссертации

Автореферат диссертационного исследования Гарифулина Р.Р. полноценно отражает основные результаты работы и полностью отвечает нормативным требованиям к оформлению.

Замечания и вопросы по диссертации

1. Почему аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный генетическим материалом вводили внутривенно, а не интратекально?

2. Почему для гистологического исследования спинного мозга и его нейронов использовали окраску гематоксилином и эозином, а не метод Ниссля? Этот классический нейрогистологический метод позволил бы подсчитать количество и оценить гибель нейронов, а также степень повреждения сохранившихся нейронов. Эти данные можно было бы сопоставить с результатами иммуногистохимической оценки состояния мотонейронов по экспрессии в них холинацетилтрансферазы.

3. Для оценки экспрессии холинацетилтрансферазы (ХАТ) было бы лучше определять оптическую плотность цитоплазмы перикарионов нейронов, а не их относительную иммунопозитивную площадь. Конечно, это интегральный показатель количества нейронов и содержания в них ХАТ, но лучше бы было сделать это по отдельности: при окраске по Ниссля посчитать количество нейронов на единицу площади и их размеры, а при иммуногистохимической окраске измерить в нейронах иммунореактивность ХАТ и посчитать количество холинергических нейронов.

Однако эти мелкие замечания не принципиальны и не умоляют явных достоинств диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Гарифулина Равиля Расимовича «Влияние аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом, на посттравматическую регенерацию спинного мозга у свиней», выполненная под руководством доктора медицинских наук, заведующего кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России Исламова Рустама Робертовича, является самостоятельной и законченной научной квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи по оценке морфофункционального состояния поясничного утолщения спинного мозга свиней с контузионной травмой в нижнегрудном отделе в условиях внутривенного введения аутологичного лейкоконцентрата, несущего терапевтические гены *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*.

Данное исследование отличается высоким методическим уровнем, несомненной актуальностью и содержит новые научные данные о клеточных механизмах распространения процессов нейродегенерации в спинном мозге после его травмы. Особую ценность представляют данные о влиянии полученного генно-клеточного препарата на сохранность поясничного утолщения спинного мозга, что имеет существенное теоретическое и практическое значение для разработки новых методов лечения последствий позвоночно-спинномозговой травмы.

Диссертационная работа Гарифулина Р. Р. отвечает требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а автор – Гарифулин Равиль Расимович – заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Официальный оппонент:

Заслуженный деятель науки Республики Беларусь,
доктор биологических наук, профессор,
заведующий кафедрой гистологии,
цитологии и эмбриологии ГрГМУ

Зиматкин Сергей Михайлович

«27» апреля 2026 г.

Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

телефон: +375 29 7814742

адрес электронной почты: smzimatkin@mail.ru

почтовый адрес: 230009, Республика Беларусь, г. Гродно, ул. Горького, 80

Аддзел кадраў
Старшыня інспекцыі па кадрах аддзела кадраў
учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет»
О.К. Касперович
«17» 04 2026 г.