

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора Красильникова Сергея Эдуардовича
на диссертацию Аникеева Анатолия Анатольевича «Патоморфология
репаративных процессов при острой венозной блокаде в условиях применения
клеточных технологий в эксперименте», представленную на соискание ученой
степени доктора медицинских наук по специальности
14.03.02 – патологическая анатомия

Актуальность проблемы. Венозный тромбоз (тромбофлебит) характеризуется образованием тромба в просвете вены с более или менее выраженным воспалительным процессом и нарушением тока крови. Лечение этого заболевания подразумевает терапию прямыми и непрямыми антикоагулянтами, дезагрегантами, нестероидными противовоспалительными средствами и препаратами, улучшающими венозный отток. Оперативное лечение венозного тромбоза выполняется в случаях высокого риска развития тромбоэмболии легочной артерии. Однако зачастую все это не спасает от развития посттромбофлебитической болезни, проявляющейся симптомами хронической венозной недостаточности. С учетом частоты встречаемости этого недуга и наличия существенных проблем на пути его коррекции, вполне естественно и своевременно оказывается исследование новых, хорошо зарекомендовавших себя в других областях, методов клеточной терапии с использованием мезенхимальных стромальных клеток (МСК).

Последнее десятилетие ознаменовалось разработкой новых методов и исследованием источников получения такого материала. И если раньше едва ли не единственным источником МСК был костный мозг, то на сегодняшний момент считается, что МСК расположены практически во всех тканевых структурах взрослых организмов, что может являться косвенным подтверждением мультилинейного резерва в виде стволовых клеток, рассчитанных на весь онтогенез.

На сегодняшний день актуальными являются исследования тонких механизмов работы и взаимодействия МСК с поврежденной и неповрежденной тканью, а также вопросы замещения и дифференцировки МСК. Большое внимание и практическую значимость имеет исследование ортодоксальной и неортодоксальной пластичности стволовых клеток, и если в первом случае речь идет о линейно-специфической дифференцировке в различные стромальные элементы, то во втором – о дифференцировке в ткани экто- и эндодермального происхождения. Несмотря на то, что механизмы такой пластичности не до конца понятны, уже имеющиеся результаты говорят в пользу универсальности МСК в

качестве объекта клеточных технологий, применяемых в репаративной медицине.

Однако следует отметить, что остаются недостаточно исследованными пути достижения благоприятного терапевтического эффекта при использовании МСК. Так, в некоторых исследованиях указывается, что не всегда МСК участвуют в непосредственном замещении поврежденной ткани, чаще они обладают трофическим эффектом, несут с собой ферменты, цитокины, ростовые факторы. Из литературы известно об участии эндотелиальных клеток-предшественников в организации тромбов на модели артериальных тромбозов. Введение МСК предположительно способствует восстановлению нарушенного кровотока посредством реканализации тромба и прорастания новых сосудов. Все эти и многие другие исследования указывают, что МСК могут быть перспективным материалом для клеточных технологий. Еще одним побудительным мотивом расширения использования МСК являются относительная простота их выделения из тканей и высокая скорость наработки в достаточно простых условиях культивирования. Это означает в перспективе адекватность стоимости использования таких технологий.

Таким образом, актуальность данной исследовательской работы, основной целью которой стало установление особенностей репаративных реакций при использовании аутологичных МСК после острого локального нарушения венозного оттока, не вызывает сомнений. В ней хорошо различимы как теоретические, так и прикладные аспекты использования полученных данных.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций. В экспериментальном исследовании А.А.Аникеева использовано достаточное количество (224) животных инбредной линии WAG, которым моделировали острую локальную блокаду венозного оттока с введением мультипотентных МСК костномозгового происхождения. Для исследования полученных материалов (образцы лигированной вены с окружающими тканями и регионарные лимфатические узлы) использованы световая, люминесцентная и конфокальная микроскопия. Проведено иммуногистохимическое исследование и морфометрический анализ полученных образцов.

Для обработки результатов применялись современные методы статистического анализа, включавшие использование программы MS Excel 7.0. Проведено вычисление средней арифметической и его ошибки. В процессе расчетов выявлено, что распределение изучаемых данных было нормальным или близким

к таковому, в связи с чем, статистическая значимость отличий сравниваемых данных проводилась с использованием критерия Стьюдента.

Достаточный объем экспериментального материала, применение адекватных информативных методов анализа и поиск на этой основе статистически значимых ассоциаций позволили А.А.Аникееву сформулировать основанные на результатах собственных исследований объективные научные положения и выводы, достоверность и значимость которых не вызывает сомнений.

Научная новизна полученных результатов и научных положений. Соискателем впервые проведено исследование возможности применения клеточной технологии, основанной на введении аутологичных мультипотентных мезенхимных стволовых клеток костномозгового происхождения, при острой локальной блокаде магистральной вены в эксперименте. Следует отметить, в работе впервые использован приближенный к клиническим условиям способ инъекционного чрезкожного введения аутологичных МСК, который осуществлялся в проекции заблокированной вены.

Заслуживает внимания обнаруженный феномен формирования сосудов грануляционной ткани уже на 4-е сутки после введения аутологичных мультипотентных МСК в области хирургического вмешательства, процесс достигал наибольшей активности ко 2-й неделе. Более того, выяснилось, что аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения не только полностью формируют все оболочки новых сосудов, но и встраиваются в сосуды, образованные из собственных клеток.

Установлено, что аутологичные мультипотентные МСК и их детрит могут частично попадать в кровеносное и лимфатическое русло, а также в регионарные лимфатические узлы.

Автор впервые указывает, что введение стромальных клеток костномозгового происхождения может сопровождаться появлением обширных геморрагий как в месте инъекции, так и в регионарных лимфатических узлах. Следует также обратить внимание на важное замечание автора о том, что инъекция МСК после хирургического вмешательства может приводить к формированию более обширного рубца, чем на фоне такой же операции без их применения, а локальное применение МСК при ненарушенных кровообращении и лимфотоке и неповрежденных тканях может быть неэффективным.

Впервые проведено сравнительное морфологическое исследование изменений микроциркуляции при флеботромбозе и локальном препятствии кровото-

ку по магистральной вене. Впервые установлено, что инъекция аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения на фоне лигированной магистральной вены приводит к уменьшению в месте хирургического вмешательства выраженности лейкоцитарной инфильтрации и уменьшению численности нейтрофилов.

Таким образом, научная новизна рецензируемой работы не вызывает сомнений, полученные результаты вносят существенный вклад в понимание роли аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения в формирование сосудов. Диссертационное исследование является важным этапом в развитии современных клеточных технологий на основе применения аутологичных МСК в терапии социально значимых заболеваний.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов.

На достаточном экспериментальном материале получены новые данные об особенностях репаративных процессов при острой локальной блокаде магистральной вены в условиях применения аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения. Установлено, что введенные МСК принимают участие в формировании грануляционной ткани в месте хирургического вмешательства. Одним из важных практических заключений является установление факта того, что при проведении клеточной терапии возможны существенные нарушения микроциркуляции в месте инъекции и регионарных лимфатических узлах, обусловленные попаданием части введенных МСК и их детрита в кровеносное и лимфатическое русло и диссеминацией по всему организму. Следует учитывать также, что инъекции аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения после хирургического вмешательства могут сопровождаться обширным рубцеванием. В то же время при применении МСК в условиях интактного сосудистого русла при сохраненном венозном и лимфатическом оттоке большая их часть быстро элиминируется из мест инъекции.

Оценка содержания работы. Диссертация изложена на 251 странице компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материала и методов исследования, 6 глав с результатами собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка цитируемой литературы, включающего 423 источника (79 отечественных и 344 иностранных авторов). Работа иллюстрирована 18 таблицами и 70 комбинированными микрофотографиями.

Во введении четко сформулированы актуальность, цель и задачи, а также

степень разработанности темы исследования. Цель диссертации логично вытекает из актуальности проблемы, освещенной во введении – установить особенности репаративных реакций при использовании аутологичных мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костномозгового происхождения после острого локального нарушения венозного оттока в эксперименте.

В обзоре литературы представлены современные сведения, освещающие особенности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, уделено особое внимание их источникам, распределению в организме и роли в модуляции иммунных процессов. Совершенно закономерно и логично автор напоминает нам особенности образования сосудов (ангиогенез) и вновь подчеркивает особое место МСК в этом процессе. Завершается обзор литературы современными данными о применении клеточных технологий в лечении сосудистых расстройств.

Раздел «Собственные исследования» начинается с главы «Материал и методы исследования», в которой представлены группы животных и сроки забора материала. Подробнейшим образом описан метод получения аутологичных мультипотентных МСК, даны их развернутые характеристики и скрупулезно описаны все манипуляции, производимые исследователем до введения МСК, как элемента клеточной терапии. Далее автор описывает непосредственно модель острой блокады магистральной вены и пути применения аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Описаны методы морфологического и морфометрического исследования, использованные в диссертации, а также метод статистической обработки полученных данных.

В главах, посвященных результатам собственных исследований, прежде всего, проведен морфологический анализ бедренной вены с окружающими ее тканями и паховых лимфатических узлов интактных животных (глава 3). Следующие три главы собственных исследований посвящены патоморфологическому анализу репаративных процессов в регионе перевязанной вены при различных экспериментальных условиях: без коррекции, при введении МСК ложнооперированному животному с ненарушенным крово- и лимфотокком и введении МСК животному с перевязкой магистральной вены, вызывавшей ее тромбоз и тромбоз более мелких сосудов. Далее (глава 7) автор тщательно сравнивает и анализирует изменения при тромбозе и экспериментальном лигировании вены с привлечением не только полученных им данных, но и большого количества литературных источников, что приводит к четкому пониманию принципиальных

отличий при тромбозе и лигировании. Последняя глава посвящена морфометрическому анализу микроциркуляторного русла и воспалительных реакций после использования клеточных технологий в регионе лигированной вены.

В «Заключении» автор на основе полученных результатов и проведенного анализа с учетом данных современной литературы сжато формулирует основные положения диссертационного исследования о регенераторном потенциале аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения.

Выводы диссертации сформулированы четко, они соответствуют поставленным цели и задачам, обоснованы имеющимися результатами, логично вытекают из них и не вызывают принципиальных возражений. Практические рекомендации имеют прикладной характер и позволяют, в случае использования клеточных технологий, учитывать как положительные эффекты, так и возможные осложнения применения метода.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Основные результаты исследования доложены на научно-практических форумах различного уровня. По материалам диссертации опубликовано 13 работ, из них 10 работ в научных изданиях, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований, в том числе входящих в базы данных Web of Science и Scopus.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе у меня нет.

Заключение. Докторская диссертация Аникеева Анатолия Анатольевича на тему «Патоморфология репаративных процессов при острой венозной блокаде в условиях применения клеточных технологий в эксперименте», выполненная при научной консультации доктора биологических наук, профессора Елены Леонидовны Лушниковой, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в медицине (патологической анатомии) – изучены особенности репаративных реакций при использовании аутологичных мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костномозгового происхождения после острого локального нарушения венозного оттока в эксперименте, описан характер структурной реорганизации лимфатических узлов при венозной блокаде и введении МСК, установлена возможность возникновения местных и общих осложнений после применения клеточных технологий.

По актуальности, научной новизне, методическому уровню, теоретиче-

ской и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте публикаций материалов в научных печатных изданиях диссертационная работа Аникеева Анатолия Анатольевича соответствует требованиям п. 9 – 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (постановление Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 года № 842, в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 01.10.2018 г. с изменениями от 26.05.2020 г.), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автору – Аникееву Анатолию Анатольевичу – следует присудить ученую степень доктора медицинских наук по специальности 14.03.02 – патологическая анатомия.

Официальный оппонент:

Директор Института онкологии и нейрохирургии
Федерального государственного бюджетного
учреждения «Национальный медицинский
исследовательский центр им. академика Е.Н.Мешалкина»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
доктор медицинских наук, профессор

Красильников Сергей Эдуардович

Адрес учреждения:
630055, Новосибирск,
ул. Речкуновская, д. 15
Телефон: 8 (383)-347-60-99
mail@meshalkin.ru
<http://meshalkin.ru/>

« 11 » 06 2021 г.



JB