

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, Жуковой Натальи Анатольевны 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 темы исследования.** Лечение острых венозных тромбозов представляет сложную медико-социальную задачу, обусловленную чрезвычайно высоким потенциальным риском для здоровья и жизни пациентов данной патологии. Проблема чрезвычайно актуальна на фоне ухудшающейся экологической ситуации, старения населения, увеличения количества сердечно-сосудистых заболеваний, злокачественных новообразований и метаболических расстройств. Широко используемые в настоящее время традиционные методы лечения: хирургические (в том числе малоинвазивные) методики, антикоагулянтная и тромболитическая терапия, характеризуются недостаточной эффективностью, наличием осложнений и рецидивов заболевания.

Перспективным подходом к лечению флеботромбозов и сопряженных с ними тромбоэмболических осложнений является развитие регенеративной медицины, основанное на применении стволовых клеток разного происхождения для стимуляции реканализации сосудов, реваскуляризации и регенерации ишемизированных тканей. Биологическое моделирование болезней – это важный метод научного познания, который позволяет создать в эксперименте технологию стимуляции роста сосудов при острой локальной венозной блокаде с помощью применения аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) для наиболее раннего восстановления микроциркуляции в тканевом микрорайоне тромбированной вены.

Известно, что в процессе естественной эволюции тромба принимают участие костномозговые клетки-предшественники. Согласно литературным данным, эндотелиальные клетки-предшественники участвуют в организации тромбов при артериальных тромбозах. Введение экзогенных мезенхимальных стромальных клеток может влиять на восстановление нарушенного кровотока посредством реканализации тромба и облитерации тромбированных сосудов и прорастания новых. Также мезенхимальные стромальные клетки могут принимать участие в формировании грануляционной ткани непосредственно в местах хирургических манипуляций. Венозные тромбозы также являются значимой проблемой практического здравоохранения, которая требует решения посред-

ством развития и внедрения новых подходов для стимуляции репаративных процессов, в том числе, с использованием клеточных технологий.

В связи с этим актуальность данной диссертационной работы, в которой ставится целью изучение особенностей репаративных реакций при использовании аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костномозгового происхождения после острого локального нарушения венозного оттока в эксперименте, не вызывает сомнения.

**Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций.** В диссертационной работе А.А. Аникеева проведено комплексное патоморфологическое исследование органов и структур тканевого региона лигированной бедренной вены после применения аутологичных мультипотентных МСК у экспериментальных животных, а также изучены реакции регионарных органов и структур лимфатической системы.

Проведено сравнительное гистологическое изучение процессов восстановления оттока крови от тканей задней конечности у самцов линейных инбредных крыс Wag (224 животных), у которых моделировали острую локальную блокаду венозного оттока с введением аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения с трансфицированной ДНК протеина GFP и дополнительно окрашенными мембранами Vybrant® CM-Dil. Для применения клеточных технологий был выбран приближенный к клиническим условиям способ введения: аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения инъецировали через кожу в проекции заблокированной вены.

В работе использованы современные методы гистологического и молекулярно-клеточного исследования – световая, люминесцентная и конфокальная микроскопия, иммуногистохимия, морфометрия, культивирование клеток с выделением аутологичных мультипотентных МСК, проведена трансфекция указанных клеток ДНК плазмиды pEGFP-N1 для выявления их после введения.

Достоверность полученных данных не вызывает сомнений, так как автором использован в работе большой объем материала. Для обработки результатов использованы современные методы статистического анализа, использована программа MS Excel 7.0 (Microsoft, USA); вычисляли среднее арифметическое и его ошибку. Статистическую значимость отличий сравниваемых данных проводили с использованием критерия Стьюдента ( $p$ ). Проверена нормальность изучаемых количественных параметров. Достаточный объем морфологического материала, применение адекватных информативных методов анализа и поиск на

этой основе статистически значимых ассоциаций позволили А.А. Анিকেеву сформулировать научные положения и выводы, объективность и достоверность которых не вызывает сомнений.

**Научная новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций.** Соискателем впервые проведено исследование возможности применения клеточной технологии, основанной на введении аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения, при острой локальной блокаде магистральной вены в эксперименте. Автором установлено, что отток крови от конечности сразу после наложения лигатуры осуществляется по более мелким коллатеральным венам, которые постепенно расширяются и реорганизуются, что происходит без участия введенных аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения. Заслуживает внимания тот факт, что диссертантом впервые для использования клеточных технологий при нарушении венозного оттока был применен приближенный к клиническим условиям способ: введение аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения инъекционно шприцом через кожу в проекции заблокированной вены.

В диссертации впервые в эксперименте продемонстрировано, что процессы формирования сосудов грануляционной ткани после введения аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения в область хирургического вмешательства у крыс появляются уже через 4 сут и нарастают до 2 нед. Аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения не только полностью формируют все оболочки новых сосудов, но и встраиваются в образующиеся из собственных клеток.

Заслуживает внимания впервые установленный соискателем факт, что фагоцитоз макрофагами аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения с трансфицированной ДНК белка GFP и окрашенными Vybrant-СМ-Dil мембранами сопровождается быстрой деградацией флуоресцентного протеина, тогда как Vybrant-СМ-Dil или не разрушается ферментами лизосом, или разрушается очень медленно. В результате происходит накопление этого красителя в макрофагах, которые приобретают способность к интенсивной красной флуоресценции при облучении их ультрафиолетовым светом с фильтром для родамина.

Автором впервые показано, что аутологичные мультипотентные МСК костномозгового происхождения и их детрит могут частично попадать в кровеносное и лимфатическое русло и оказываться в регионарных ЛУ. Впервые обна-

ружено, что в некоторых макрофагах лимфоидных узелков и мозгового вещества регионарных ЛУ могут содержаться фрагменты аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения.

Соискатель впервые продемонстрировал, что введение аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения в ткани может сопровождаться появлением обширных геморрагий как в месте инъекции, так и в регионарных ЛУ. Диссертант впервые отметил, что инъекция аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения после хирургического вмешательства может приводить к формированию значительно более обширного рубца, чем на фоне такой же операции без их применения. Автор впервые акцентировал внимание, что локальное применение аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения при ненарушенном кровообращении и лимфотоке и неповрежденных тканях может быть неэффективным вследствие быстрой элиминации введенных клеток из места инъекции.

Диссертант впервые провел сравнительное морфологическое исследование изменений микроциркуляции и выявил основные различия при флеботромбозе и локальном препятствии кровотоку по магистральной вене. Автором установлено, что при тромбозе поражается участок сосуда на большом протяжении вместе с коллатеральями, по которым тромбин ретроградно проникает глубоко в ткани и блокирует венозный отток даже по мелким сосудам, то есть нарушается кровообращение в значительном объеме тканей. Прокходимость магистральной вены при тромбозе быстро восстанавливается, но длительное время сохраняются нарушения микроциркуляции тканевого региона, для устранения которых необходима стимуляция ангиогенеза с развитием новых кровеносных сосудов. При лигировании вены возникает локальная непроходимость сосуда, застой компенсируется коллатеральями и перфорантными венами без необходимости стимулирования ангиогенеза с помощью МСК.

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 расширяют научные знания о патогенезе острых венозных тромбозов, особенностях эффекторных механизмов использования аутологичных МСК.

**Теоретическая и практическая значимость полученных результатов** определяется тем, что получены новые знания об особенностях репаративных процессов при острой локальной блокаде магистральной вены в условиях применения аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения. Автором на большом экспериментальном материале выявлены и систематизированы данные о том, что введение аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения усиливает репаративные процессы в поврежденных при операции тканях, может привести к распространению части введенных МСК и их детрита посредством кровяного и лимфатического русла и фагоцитоза макрофагами даже в отдаленные от места введения ткани организма, а также способствует формированию обширных геморрагий как в месте инъекции, так и в регионарных лимфатических узлах.

В практическом плане важно учитывать, что инъекции аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения после хирургического вмешательства могут сопровождаться обширным рубцеванием, захватывающим и прилежащие ткани. Инъекционное введение аутологичных мультипотентных МСК костномозгового происхождения при ненарушенном кровообращении и лимфотоке в неповрежденных тканях может оказаться малоэффективным.

**Оценка содержания работы.** Диссертационная работа написана в классическом стиле, изложена на 251 странице компьютерного текста, иллюстрирована 18 таблицами и 70 комбинированными микрофотографиями. Библиографический указатель включает 423 источника (79 отечественных и 344 иностранных авторов). Важно отметить, что в список входит большое количество работ, опубликованных за последнее десятилетие.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы «Материал и методы исследования», 6 глав с результатами собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, и списка цитируемой литературы. Во введении четко сформулированы актуальность исследования, цель работы и задачи. В обзоре литературы анализируются современные представления о роли мультипотентных стромальных клеток в стимуляции процессов репаративной регенерации.

Во второй главе представлена подробная характеристика материалов и методов исследования. Приведены подробные данные о применяемых методах патоморфологического исследования и статистической обработке результатов. Методы исследования вполне современные, адекватны поставленным задачам.

В главах, посвященных результатам собственных исследований, автором проведен комплексный морфологический анализ тканей региона бедренной вены у интактных животных, патоморфологический анализ репаративных процессов в тканевом регионе перевязанной вены без коррекции и в условиях введения аутологичных мультипотентных МСК без изменения кровотока. Подробно описаны патоморфологические особенности репаративных процессов в тканевом регионе лигированной вены при использовании клеточных технологий, наблюдаемые спустя 4 суток, 1, 2, 3, 4, 5 недель после оперативного вмешательства. Проведен сравнительный анализ морфологических изменений при экспериментальном тромбозе и лигировании вены, морфометрический анализ микроциркуляторного русла и воспалительных реакций после использования клеточных технологий в регионе лигированной вены.

В заключении автор на основе проведенного анализа и полученных результатов, используя современную литературу, сформулировал основные положения диссертационного исследования.

Выводы диссертации сформулированы четко, они соответствуют поставленным целям и задачам, обоснованы имеющимися результатами, логично вытекают из них и не вызывают принципиальных возражений.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Основные результаты исследования доложены на научно-практических форумах различного уровня. По материалам диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 10 статей в рецензируемых журналах по списку ВАК.

Все сказанное позволяет высоко оценить данную работу А.А. Аникеева. 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 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) – установлены особенности репаративных реакций при использовании аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костномозгового происхождения

после острого локального нарушения венозного оттока в эксперименте.

По актуальности, научной новизне, методическому уровню, теоретической 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 изм. 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:**

Ведущий научный сотрудник  
лаборатории фармакологических исследований  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Новосибирского института  
органической химии имени Н.Н. Ворожцова  
Сибирского отделения Российской академии наук  
доктор медицинских наук

Жукова Наталья Анатольевна

Адрес учреждения:  
630060, Новосибирск,  
пр. Академика Лаврентьев:  
тел. 8(383) 330-88-50  
<http://web.nioch.nsc.ru>  
[benzol@nioch.nsc.ru](mailto:benzol@nioch.nsc.ru)

7 июня 2021

Подпись Жуковой Н.А. за  
Ученый секретарь ФГБУН  
НИОХ СО РАН,  
кандидат химических наук



Бредихин Р.А.