

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію Акіноли Самуеля Толувані «Хірургічна корекція демієлінізуючих ушкоджень центральної нервової системи із застосуванням мезенхімальних стовбурових клітин (експериментальне дослідження)», поданої до Спеціалізованої вченої ради Д 26.557.01 при ДУ «Інститут нейрохірургії ім.акад.А.П.Ромоданова НАМН України» на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.05 – нейрохірургія

Актуальність теми дослідження

Лікування демієлінізуючих захворювань є одним з найбільш актуальних розділів медицини. На сьогоднішній день у світі налічується понад 3 млн. хворих тільки на розсіяний склероз (РС) (Kampuraj D., et al., 2016; Абдурахманова Р.Ф. и др., 2016; Marvin M.G., 2012). Захворювання частіше виникає у осіб працездатного віку, має прогресуючий перебіг, спричиняє стійку інвалідизацію та втрату соціальної активності (Шмидт Т.Е., 2014), що обґрунтовує пошук ефективних методів лікування даної патології. Більшість сучасних методів лікування спрямована на профілактику або сповільнення прогресування демієлінізуючих і дегенеративних змін ЦНС, проте залишається невирішеним питання можливостей та умов відновлення ушкоджених структур і функціональних систем ЦНС.

Важливою складовою вирішення цих завдань є експериментальні дослідження з використанням лабораторних тварин.

Експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ) тварин є моделлю розсіяного склерозу людини, особливо, його аутоімунного компоненту. У морфогенезі ЕАЕ на різних етапах істотне значення має поєднання процесів демієлінізації, запалення, клітинної та аксональної дегенерації.

Розвиток клітинних технологій прискорив певний прогрес у перспективах лікування запально-дегенеративних уражень нервової системи

людин (Лисяний М.І. та ін., 2015; Shroff G., 2016). Сучасний рівень знань про властивості стовбурових клітин (СК) дозволяє прогнозувати їх широке застосування у лікуванні дегенеративних захворювань ЦНС (Семенова В.М., 2014). При цьому, обов'язковою є відповідність певним умовам: джерела отримання СК повинні бути доступні, відсутність морально-етичного конфлікту, можливість отримання великої кількості клітин за короткий проміжок часу шляхом культивування і збереження при цьому мезенхімального фенотипу, здатністю до трансдиференціювання, хоумінгу і секретувати необхідні біологічно активні речовини (цитокіни та ін.), мати низьку імуногенність (Цимбалюк В.І. та ін.; Лисяний М.І. та ін., 2015; Медведєв В.В., 2017). Цим вимогам у повній мірі відповідають мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) Вартонових драглів пуповини (Changhui Z. et al., 2011; Kovalchuk M.V. et al., 2015). Вони, на відміну від кісткового мозку та жирової тканини, містять МСК ембріонального походження (є дані про можливість експресії ними ембріональних маркерів Oct4 і Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA-1) з навіть плюрипотентним стовбуровим потенціалом (Patel A. et al., 2008; Armand K., 2012; Цимбалюк В.І., 2015). У численних експериментальних дослідженнях встановлена тропність і міграційна здатність МСК різного походження до вогнища ураження у мозкові (Phinney D.G. et al., 2006; Kovalchuk M.V. et al., 2015). У ряді робіт досліджена здатність диференціювання МСК в олігодендроцити і шванівські клітини (Maslova O.O. et al., 2013; Jeffrey A. et al., 2013).

Сучасним перспективним напрямком лікування патології ЦНС є також застосування трофічних факторів, клітин, які їх продукують, та клітин-попередників олігодендроцитів для відновлення зруйнованої мієлінової оболонки аксонів (Adami R. et al., 2014; Dulamea A.O. et al., 2017). Стовбурові клітини здатні продукувати ці фактори. Попереднє введення хірургічним шляхом у ліквор протизапальних цитокінів може сприяти виживанню трансплантованих у вогнище запалення МСК, підсилити синтез ними цитокінів, що позитивно вплине на процеси де- і ремієлінізації структур

ЦНС. Цим питанням присвячені поки що поодинокі дослідження (Barhum Y. et al., 2010; Федулов АС и др., 2016).

Таким чином, дослідження впливу мезенхімальних стовбурових клітин як корегуючого фактора на перебіг захворювання є актуальним, і має як фундаментальне, так і прикладне значення з перспективою подальшого можливого клінічного застосування.

Тому дисертаційна робота Акінола С. Т. «Хірургічна корекція демієлінізуючих ушкоджень центральної нервової системи із застосуванням мезенхімальних стовбурових клітин (експериментальне дослідження)» присвячена надзвичайно актуальній проблемі сучасної нейрохірургії.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, які містяться в дисертації.

Дисертаційне дослідження проведено протягом 2016-2019 рр. в ДУ «Інститут нейрохірургії ім.акад.А.П.Ромоданова НАМН України», окремі етапи роботи були виконані на базі Інституту молекулярної біології і генетики НАН України згідно договору про співпрацю №115 від 07.04.2017 р.

Основні фрагменти роботи виконані в рамках комплексної науково-дослідної роботи ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України»: “Дослідити біологічні властивості та визначити відновлювальний потенціал кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини при лікуванні рухових порушень в експерименті” за № державної реєстрації 0116U001030).

Дослідження виконано на 104 білих безпородних щурах-самицях, утримуваних у стандартних умовах віварію ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України" з дотриманням чинних норм біоетики. На 32 тваринах було відпрацьовано модель ЕАЕ з хронічним рецидивуючим перебігом та її удосконалення шляхом застосування різної кількості мікобактерій туберкульозу у застосованому ад'юванті Фрейнда.

Проведено морфологічний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин протягом пасажування, оцінку структури клітин із застосуванням флуоресцентної і конфокальної мікроскопії, визначення поверхневих маркерів за допомогою FACS-аналізу. Доведена необхідність застосування для трансплантації МСК не вище 2 пасажу при культивуванні.

Тварини були розділені на 6 груп. 1 група тварин з ЕАЕ була групою порівняння. 6 група – інтактні тварини. 4 групи експериментальних тварин, яким у різних поєднаннях інтратекально, або внутрішньовенно вводили МСК або інтерлейкін-10.

Досліджували здатність трансплантованих ксеногенних МСК до хоумінгу після інтратекального введення в ліквор протягом 10 днів із застосуванням ПЛР - аналізу. Дослідження поведінкових реакцій і клінічного перебігу проводили протягом 32 днів, морфологічні зміни тканини мозку вивчали на клітинному і субклітинному рівнях на 35 і 60 доби.

Результати статистичної обробки даних з використанням сучасного ліцензійного програмного забезпечення (STATISTICA 6.1 і MS Excel 2007) та адекватних завданням дослідження тестів обумовили високу достовірність одержаних даних, на підставі яких автор обґрунтував наукові положення, висновки та практичні рекомендації щодо можливого у майбутньому застосування МСК при демієлінізуючих ушкодженнях нервової системи.

Таким чином, дисертаційна робота Акіноли Самуеля Толувані виконана на великому експериментальному матеріалі з використанням сучасних методів функціонального тестування та морфологічних досліджень. Використані методи досліджень є сучасними, об'єктивними та доцільними, а отримані наукові положення, висновки та рекомендації базуються на достатньому експериментальному матеріалі, науково обґрунтовані та достовірні.

Наукова новизна одержаних результатів

У дисертації на підставі проведеного комплексного дослідження в експерименті представлено новий підхід до вирішення актуальної наукової задачі в нейрохірургії – корекції демієлінізуючих ушкоджень ЦНС шляхом застосування мезенхімальних стовбурових клітин Вартонових драглів пуповини. Виявлено, що удосконалена модель ЕАЕ супроводжується розвитком хронічного рецидивуючого перебігу, приводить до суттєвих структурних змін ЦНС і адаптивної поведінки експериментальних щурів. Модель відтворювана і може застосовуватись для дослідження ефективності різних лікувальних стратегій.

Також підтверджено, що при культивуванні МСК Вартонових драглів протягом 2 пасажів зберігають свої біологічні властивості. У подальшому появляються ознаки деградації культури та втрати клітинами мезенхімального мультипотентного фенотипу.

В роботі поглиблено знання щодо особливостей виживання і міграції (хоумінгу) ксеногенних МСК в організмі експериментальних тварин.

Автором доведено, що найбільш ефективною схемою корекції порушень адаптивної поведінки щурів з ЕАЕ є внутрішньовенне введення ІЛ-10 на 10-у добу експерименту і МСК субокципітально – на 17-у добу, що забезпечує їх міграцію поза гематоенцефалічним бар'єром та прискорення відновних процесів у ЦНС.

Встановлено, що ІЛ-10 у поєднанні з трансплантацією ксеногенних МСК сприяють відновленню поведінкових реакцій, рухової активності тварин і гальмують процеси демієлінізації уже в ранні терміни дослідження

Практична значущість отриманих результатів

Практична значущість отриманих результатів полягає в тому, що удосконалена модель ЕАЕ відтворювана і може застосовуватись для

дослідження механізмів впливу різних лікувальних заходів на дегенеративно-деструктивні та відновно-приспосувальні процеси ЦНС в експерименті.

Автором застосовані ефективні способи введення МСК: субокципітально та внутрішньовенно, що надає можливість доставки клітин в зону ушкодження ЦНС.

Повнота викладення основних положень дисертації та практичного впровадження отриманих результатів

Результати дослідження та всі положення дисертації, що винесено на офіційний захист, широко викладено у 10 друкованих роботах, з них 6 статей (одноосібно – 1) у спеціалізованих наукових виданнях (рекомендованих ДАК МОН України до публікації основних результатів дисертаційних робіт у галузі медичних наук); 2 – тез доповідей на конгресах, з'їздах і конференціях.

Основні положення дисертаційної роботи представлені та обговорені на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Інновації в нейрохірургії». Київ, 25-26 квітня 2017р. та на VI з'їзді нейрохірургів України, Харків, 14–16 червня 2017 року.

Оцінка змісту дисертації та її завершеність

Дисертація, що представлена автором, є закінченою науковою роботою і викладена на 156 сторінках (перелік використаних джерел – 19 сторінок) і ілюстрована 11 таблицями, 42 рисунками. Робота побудована за загальноприйнятим планом, складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, розділу результатів власних досліджень, аналізу та обговорення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел, що містить 154 найменувань, з них 58 – кирилицею, 98 – латиницею, додатків.

У вступі обґрунтована актуальність теми, визначена мета, відповідно якій поставлені завдання дослідження, об'єкт і предмет, а також методи дослідження, наукова новизна та практичне значення роботи.

Перший розділ дисертаційної роботи викладено на 20 сторінках маштнописного тексту і присвячений огляду літератури. В огляді літератури представлено аналіз сучасних поглядів на стан проблеми демієлінізуючих захворювань, насамперед, розсіяного склерозу (РС). В першій частині огляду літератури описані основні патогенетичні механізми процесу демієлінізації в ЦНС та можливості його корекції, а також механізми імунної відповіді, гуморальний механізм комплементзалежного лізису клітин-мішеней у ЦНС, фагоцитоз уламків мієліну макрофагами і їх розщеплення у лізосомах, 5 типів порушень структур мієліну при РС. Далі автор зупиняється на патогенетичній терапії РС, особливо на нейрохірургічних способах: введення у речовину мозку та лікворні простори (інтрапаренхімальне введення, в ліквор великої потиличної цистерни або поперекового відділу) лікарських засобів і клітин дозволяє уникнути проблем, що виникають за системного застосування нових препаратів: у кілька разів зменшити їх дози, забезпечити доставку у вогнища демієлінізації трофічних факторів, генних конструкцій і клітин, уникнути їх небажаного швидкого розпаду. Дисертант обґрунтовано доводить доцільність використання інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) при аутоімунних захворюваннях.

В другій частині першого розділу розглядаються особливості мезенхімальних стовбурових клітин Вартонових драглів пуповини людини. Автор підкреслює, що пуповина, як похідне жовткового мішка та алантоїсу, містить примітивну форму позазародкової мезенхіми – мукозну сполучну тканину (Вартонові драгли), яка за своїм клітинним складом та будовою займає проміжне становище між ембріональною мезенхімою та дорослою сполучною тканиною.

Третя частина огляду літератури присвячена оптимізації моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з хронічним рецидивуючим перебігом.

В цілому огляд літератури демонструє знання автором літератури останніх років щодо проблеми, яка вивчається.

У **другому розділі** роботи представлені дані щодо матеріалу та методів дослідження хворих. Цей розділ викладено на 16 сторінках машинописного тексту, ілюстровано 1 рисунком та 2 таблицями. В ньому дисертант детально описав метод удосконалення моделі ЕАЕ на щурах шляхом застосування ад'юванта Фрейнда з різним вмістом мікобактерій туберкульозу, дослідження біологічних властивостей МСК і їх зміни в процесі культивування. Для виявлення ксеногенних МСК в окремих відділах ЦНС та у лікворі застосовано ПЛР-аналіз із специфічними до альфа-сателітних послідовностей ДНК праймерами. Поведінкові реакції досліджені у тесті «Відкрите поле», перебіг ЕАЕ – за 6 бальною шкалою. Дослідження морфологічних змін тканини мозку проводили із застосуванням класичних методів світлової і електронної мікроскопії. Цікавим є запропонований в Інституті нейрохірургії метод оцінки ступеня вираженості демієлінізації провідників спинного мозку шляхом вирахування коефіцієнта співвідношення товщини мієлінової оболонки до діаметра осевого циліндра.

Зауважень до розділу немає. **Виникло запитання:** чи запатентований спосіб оцінки ступеня демієлінізації?

РЕЗУЛЬТАТИ досліджень представлено на 65 сторінках у 4 розділах. Вони гарно ілюстровані рисунками і графіками.

У **третьому розділі** представлені результати власних досліджень. Цей розділ викладено на 16 сторінках машинописного тексту, ілюстровано 1 таблицею та 5 рисунками. Він складається із 6 підрозділів. Автором здійснено детальний аналіз методики виділення, визначення біологічних властивостей мезенхімальних стовбурових клітин з Вартонових драглів пуповини в умовах культивування, методи морфологічних досліджень мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), оптимізована модель ЕАЕ з хронічним рецидивуючим перебігом, визначено 6 груп тварин в залежності від маніпуляцій.

Одним із методів оцінки стану нервової системи є дослідження поведінкових реакцій, які базуються на вивченні орієнтовно-дослідницької реакції тварин. Крім того, автор оцінював клінічний перебіг ЕАЕ щурів за бальною шкалою (Шкала тяжкості ЕАЕ). Заключним етапом оцінки впливу введених клітин було дослідження ультраструктурних змін спинного мозку щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом під впливом мезенхімальних стовбурових клітин та інтерлейкіна-10. Оцінку ступеня демієлінізації, що спостерігалась в мієлінізованих нервових волокнах тканини спинного мозку, проводили із застосуванням розробленого дисертантом зі співавторами морфометричного критерію - коефіцієнта відношення товщини мієлінової оболонки до діаметра осьового циліндра.

До розділу є запитання: чим підтверджена авторство розробленого морфометричного критерію?

Четвертий розділ дисертації присвячено аналізу результатів оптимізації моделі ЕАЕ з хронічним рецидивуючим перебігом і викладено на 6 сторінках. За даними патоморфологічного дослідження поперекового відділу спинного мозку щурів з індукованим подвійною дозою АФ ЕАЕ на 35-у добу визначається значне поширення демієлінізуючого процесу та збільшення вмісту нейроклітин з дистрофічно-некробіотичними змінами. Дисертант приходить до висновку, що застосування подвійної та потрійної доз АФ для індукції ЕАЕ у щурів обумовлює поступове поширення і збільшення процесу демієлінізації аксонів у білій речовині та вмісту пошкоджених нейроцитів у сірій речовині спинного мозку.

Таким чином, за даними автора, проведені дослідження, спрямовані на пошук оптимальної дози АФ для індукції ЕАЕ у щурів, показали, що найбільш поширений процес демієлінізації у тканині спинного мозку цих піддослідних тварин відтворюється при використанні потрійної дози АФ. Цей процес супроводжується появою дистрофічно-деструктивних змін у більшості нейроцитів сірої речовини спинного мозку. Але рівень

захворюваності у таких тварин настільки важкий, що унеможливило спостереження за ними в тесті «відкрите поле». Таким чином, по результатах проведених досліджень, можна зробити висновок про достатність використання однієї дози АФ для отримання ефективної моделі експериментального алергічного енцефаломієліта з хронічним рецидивуючим перебігом у щурів протягом 35 діб.

П'ятий підрозділ присвячено аналізу особливостей поведінкових реакцій і перебігу ЕАЕ пі впливом ксенотрансплантації МСК.

За даними автора перші прояви ЕАЕ починалися з 10 доби спостереження, пік захворювання становив 17-19 добу. Щурам субоципітально вводили ксеногенні МСК. Через 7 діб після введення клітин було візуально відмічено прискорення поновлення м'язового тону кінцівок експериментальних тварин, покращення рухів та сили м'язів кінцівок і хвоста.

При вивченні впливу МСК, ІЛ-10 та МСК в поєднанні з ІЛ-10 на поведінкові реакції щурів з індукованим ЕАЕ у «відкритому полі» доведено, що ІЛ-10 справляє менш виражений вплив, ніж МСК та МСК і ІЛ-10. Застосування МСКТ у щурів при індукованому ЕАЕ під час тестування у «відкритому полі» сприяло статистично значущому зменшенню вертикальної локомоторної активності та підвищенню емоційної активності, а також частково корегувало показники горизонтальної локомоторної активності, що наближалися до показників у інтактних тварин. При порівнянні впливу МСКТ і МСК на поведінкові реакції щурів встановлено, що МСКТ статистично значуще зменшували емоційну і дослідницьку активність тварин та позитивно впливали на показники горизонтальної локомоторної активності, що статистично значуще збільшувалися, наближаючись до таких в інтактних щурів. Результати дослідження показали, що МСКТ справляли більш виражений вплив на поведінкові реакції щурів, ніж МСК.

Отже, результати дослідження свідчили про можливість корекції порушень поведінки щурів при індукованому ЕАЕ шляхом комбінованого застосування (МСК та ІЛ-10), відзначали послаблення негативного впливу емоційного стану, що супроводжувалося збільшенням орієнтовно-дослідницької активності та нормалізацією поведінкових реакцій тварин.

Цей розділ викладено на 15 сторінках машинописного тексту, ілюстровано 4 таблицями та 5 рисунками.

Розділ 6, являючись найбільш об'ємним (33 сторінки), присвячено результатам дослідження морфологічних змін спинного мозку щурів з ЕАЕ під впливом МСК та ІЛ-10.

Тварини з ЕАЕ (група порівняння) характеризуються на електронно-мікроскопічному рівні деструктивними змінами клітин олігодендроцитів та поширеною демієлінізацією, що є основною морфологічною ознакою енцефаломієліту і, за даними світової літератури та попередніх досліджень лабораторії електронної мікроскопії є найвираженішою у спинному мозку експериментальних тварин на рівні поперекового відділу. Ультраструктурні зміни вивчалися на рівні олігодендроцитів, синапсів та нейронів.

Доведено, що найбільш оптимальною схемою є введення внутрішньовенно інтерлейкіна-10 на 10 добу після моделювання ЕАЕ і інтратекально МСК на піку захворювання (17 доба).

Розділ написаний дуже добре. **Зауваження:** чи не забагато ілюстративного матеріалу у цьому розділі?

Запитання: Ви не проводили імуногістохімічні дослідження для визначення долі трансплантованих МСК?

Розділ Заключення (8 сторінок) не містить рисунків. Він присвячений узагальненню і аналізу результатів дослідження. Дисертант акцентує увагу на характеристиці результатів проведених досліджень, їх науковій та практичній цінності, основних закономірностях перебігу демієлінізуючих

процесів і ремієлінізації під впливом МСК та протизапального цитокіна – інтерлейкіна-10..

На підставі отриманих результатів автор робить 7 обґрунтованих **висновків**, які логічно випливають із проведеного дослідження, відповідають меті та завданням роботи.

Дисертація містить 2 додатки. У 1 представлено аналіз динамічних рядів клінічного стану щурів експериментальних груп, у 2 – список публікацій здобувача.

Зміст автореферату відображає основний зміст дисертації.

Дисертація Акіноли Самуеля Толувані є завершеною самостійною науковою роботою.

За темою дисертаційної роботи опубліковано 10 наукових праць, у тому числі 8 статей у фахових періодичних виданнях, рекомендованих МОН України та цитуються у міжнародних наукометричних базах, з яких 5 статей у співавторстві засвідчують основні результати дисертаційного дослідження, 3 статті – додатково відображають результати дисертації, 2 тез доповідей на конференції та з'їзді нейрохірургів України.

При роботі над дисертацією виникли зауваження, які більше стосуються оформлення результатів дисертації і не носять принципового характеру.

В процесі знайомства з результатами наукових досліджень, представлених в дисертації, виникло ще кілька **запитань** до автора дисертаційної роботи:

1. Чи здатні МСК самостійно синтезувати інтерлейкін-10?
2. Наскільки можливо застосувати запропонований метод в клініці?

Запитання, які виникли при рецензуванні роботи, та зауваження стосуються методологічних засад дисертаційного дослідження, не мають принципового характеру і жодним чином не применшують її загальну позитивну оцінку.

Дисертація Акіноли Самуеля Толувані «Хірургічна корекція демієлінізуючих ушкоджень центральної нервової системи із застосуванням

мезенхімальних стовбурових клітин (експериментальне дослідження)» на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук є завершеною, самостійною науковою працею, в якій автором особисто на достатньому матеріалі з використанням сучасних методів дослідження та аналізу даних отримано нові оригінальні та вагомі наукові дані, що в сукупності вирішують актуальне наукове завдання нейрохірургії - експериментальне обґрунтування застосування мезенхімальних стовбурових клітин для корекції демієлінізуючих ушкоджень центральної нервової системи. За обсягом виконаних досліджень, актуальністю обраної теми, науковою новизною та практичною значущістю, сучасним рівнем дослідження, глибиною аналізу матеріалу дисертаційна робота Акіноли Самуеля Толувані відповідає зазначеній спеціальності 14.01.05 — нейрохірургія, профілю Спеціалізовано вченої ради Д 26.557.01 і вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. №567, а її автор, Акінола Самуель Толувані, заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.05 – нейрохірургія.

Завідувач кафедри нейрохірургії
Харківського національного медичного
університету МОЗ України
доктор мед. наук, професор



[Handwritten signature]

П'ятикоп В.О.