

ВІДЗИВ

**офіційного опонента члена-кореспондента НАМН України,
доктора медичних наук, професора**

Лісяного Миколи Івановича

**на дисертаційну роботу Цупикова Олега Михайловича «Вплив
трансплантації стовбурових клітин на процеси регенерації нервової
тканини після ішемічного ушкодження головного мозку», поданої на
здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю
14.03.04 – патологічна фізіологія.**

Актуальність обраної теми дисертації.

Вивчення механізмів репаративної регенерації тканин та органів при різних патологічних процесах є актуальним завданням патологічної фізіології. З'ясування цих механізмів дозволить запропонувати нові підходи для корекції багатьох патологічних станів, зокрема ішемічно-реперфузійних ушкоджень головного мозку. Наслідки ішемічного ушкодження нервової тканини можуть бути компенсовані завдяки активації власних репаративних механізмів або корекції за допомогою різних терапевтичних підходів. Тому ведеться пошук нейропротекторних засобів, здатних впливати на механізми ішемічно-реперфузійних ушкоджень головного мозку. Одним з перспективних напрямків у лікуванні та реабілітації пацієнтів з ішемічними ураженнями головного мозку є клітинна терапія із використання стовбурових клітин. В основу таких досліджень покладено теоретичні та експериментальні розробки, що вказують на здатність стовбурових клітин диференціюватися в нейрони або гліальні клітини, компенсуючи тим самим функцію загиблених тканин. Оскільки ще не до кінця встановлені як механізми репаративної регенерації нервової тканини під час ішемічного ушкодження головного мозку так і механізм дії стовбурових клітин, виникає необхідність проведення експериментальних досліджень впливу трансплантації стовбурових та прогеніторних клітин різного генезу на процеси регенерації нервової тканини

в ЦНС. Саме тому тема дисертаційної роботи О.М. Цупикова, яка спрямована на вирішення позначеного кола питань, дійсно є актуальною.

Наукова новизна та ступінь обґрунтованості висновків, сформульованих у дисертації.

Результати дисертаційного дослідження отримані з використанням апробованих сучасних методів, які є адекватними до поставлених завдань. Обсяг фактичного матеріалу, його інтерпретація та статистичне опрацювання переконують в обґрунтованості висновків роботи.

Сукупність результатів дисертації характеризують його новизну. На створеній під час виконання дисертаційної роботи *in vitro* моделі ПВЛ уперше показано, що ММСК в умовах їх безконтактного співкультивування зі зрізами головного мозку мають нейропротекторний вплив на нервову тканину, зменшуючи реактивний астро- та мікрогліоз та збільшуючи кількість Рір-імунопозитивних олігодендроцитів.

Вперше на моделі короткотривалої ішемії головного мозку мишей продемонстровано, що субокципітально введені фетальні клітини здатні до міграції у зони пошкодження та диференціюватись у гіпокампі як в астроцити, так і нейрони і переживати там на протязі мінімум 3 місяців. Автором методами імуногістохімії та електронної мікроскопії показано, що трансплантовані ксеногенні прогеніторні клітини можуть утворювати синаптичні контакти з нейронами реципієнтів, що відкриває новий шлях до широкого використання клітинної терапії в клініці.

Цупиков О.М. разом із співавторами дослідив вплив трансформації НПК у напрямку надекспресії FGF-2 на поведінку цих клітин після їх трансплантації у соматосенсорну кору щурів з ішемічним ушкодженням мозку та можливість утворення ними локальних навколосудинних проліферативних кластерів із нейрогенним потенціалом. Уперше показано, що надекспресія FGF-2 у НПК сприяє їх тісному контакту з судинною мережею та формуванню навколосудинних BrdU-позитивних спіралеподібних проліферативних кластерів та утворенню пулу незрілих DCX-позитивних нейронів у відповідь

на ішемічне ушкодження мозку.

До безперечно нових даних належать отримані результати, які свідчать про те, що НПК, які надекспресують EMMPRIN, мігрують у пошкоджену соматосенсорну кору далі порівняно із контрольними НПК та утворюють популяцію нейральних прогеніторів у пошкодженій ділянці кори.

З використанням імуно-електронно-мікроскопічного аналізу вперше показано, що GFP-негативні аксони щура формують синаптичні контакти на GFP-позитивних трансплантованих нейронах, утворених з іПСК людини, і більшість з цих контактів мають ультраструктурні характеристики збуджувальних глутаматергічних синапсів.

Теоретичне та практичне значення роботи.

Отримані дані мають фундаментальне значення для патологічної фізіології, оскільки помітно розширюють існуючі уявлення про механізми репаративної регенерації нервової тканини під час ішемічного ушкодження головного мозку та ролі в цих процесах стовбурових клітин. Практичне значення одержаних результатів полягає в знаходженні нових підходів для лікування ішемічних уражень головного мозку та обґрунтуванні застосування методів клітинної терапії із використанням стовбурових клітин при цій патології. Результати дисертаційної роботи впроваджені в матеріали науково-методичних рекомендацій кафедри гістології та ембріології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця та Центру молекулярних і клітинних досліджень Національного університету «Києво-Могилянська академія».

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертація виконана в межах НДР відділу цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України: «Дослідження регенеративного потенціалу мезенхімальних стовбурових клітин при перинатальній патології ЦНС» (2015-2019 рр.) №00115U003633, «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних механізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патологіях» (2012-2016 рр.) №0112U001475, «Клітинні та

молекулярні механізми нейродегенерації та шляхи її корекції» (2014-2018 рр.) №0113U007273; на базі державної ключової лабораторії молекулярної та клітинної біології – «Молекулярні та генетичні механізми клітинної сигналізації в нормі та патології» (№UF45.2/001); у рамках гранту Президента України для підтримки наукових досліджень молодих учених «Клітинна терапія при експериментальному ішемічному ушкодженні головного мозку» (2010-2011 рр.) №0111U005283, у рамках спільного проекту НАН України та Українського науково-технологічного центру «Вплив трансплантації стовбурових клітин на процеси регенерації нервової тканини при перинатальній патології ЦНС» (2014-2016 рр.) № 0114U006119, у рамках спільного швейцарського-українського проекту SCOPES «Ectopic niche formation by grafted neural stem/progenitors in the ischemic cerebral cortex» (2009-2012 рр.) № IZ73Z0_1 28015.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертаційна робота оформлена згідно з новими вимогами ДАК МОН України (наказ МОН України від 12.01.2017 №40). Дисертаційна робота викладена на 335 сторінках машинописного тексту і містить анотації, зміст, перелік умовних позначень, вступ, основну частину (огляд літератури, опис застосованих методів та матеріалів досліджень, 6 розділів експериментальних результатів та їх обговорення), висновки, список 357 використаних джерел та додатку. Робота добре проілюстрована 107 рисунками та 3 таблицями.

Слід відзначити чітку структурованість, послідовність і логічність викладення, якісне оформлення тексту. Якісний ілюстративний матеріал відповідає отриманим даним і сприяє кращому сприйняттю матеріалу. Характеристика окремих розділів дисертації. У вступі приведені коротко дані про актуальність, новизну, практичну значимість роботи. Огляд літератури складається із 3 підрозділів, де розглядаються природа стовбурових клітин, ішемічні враження головного мозку та використання НСК при ішемії. Розділ написаний добре, великий по об'єму з використання сучасної літератури. В якості зауваження можна сказати наступне, в назві роботи іде мова про

регенерацію нервової системи .але такого розділу в огляді немає. Дещо схематично на 4 стр написано використання НСК при ішемії та перинатальній патології.

Розділ «Матеріали та методи» дуже великий, де приведені велика кількість експериментальних методик та глибоких сучасних імуногістохімічних та генетичних методик,що дозволяє зробити висновок як про ширину так і глибину досліджень. Методи повністю відповідають поставленим задачам. В наступних4 розділах вивчаються послідовно, фетальні нервові клітини, нейтральні прогеніторні клітини, мезенхімальні та індуковані прогеніторні клітини на різних моделях ушкодження мозку Всі розділи добре ілюстровані і виконані на великій кількості спостережень і могли бути матеріалом окремих дисертацій , Є деякі технічні зауваження до викладу матеріалу, але вони не зменшують загального позитивного враження, В той же час кидається в очі, що трансплантація клітин в різних дослідках проводилась в різний час після моделювання патології, що ускладнює аналіз результатів. Незрозумілим є і те, що на одних моделях є міграція клітин по мозку а в інших немає , з чим це пов'язано, це потрібно пояснити.

Розділ 6 та 7 присвячений ідеї активації,або модулюванні функції НСК, а саме придачі стовбуровим клітинам нових властивостей за допомогою трангенних методик з генами факторів росту та метало протез. Показано позитивній вплив цих модифікованих клітин на ішемічні враження ЦНС. Це дуже цікавий та теоретично перспективний напрямок в роботі. В той же час виникає засторога по утворенню окремих ектопічних кластерів з нейрогенним потенціалом,що може приводити до генерації біоселективної готовності ра розвитку судомного синдрому. Останній розділ присвячений індукованим прогеніторним клітинам людини , які отриманні методом трансфекції певних генів. Показано, що клітини людини можуть допомагати щурам із ішемією а також інтегруватись з нейронами щура. Це поки перші результати , але коли мають велику перспективу в майбутньому.

Заклучення написано добре хоча і дещо велике. Особливих зауважень

немає. Висновки в кількості 9 відповідають задачам, але отримані результати значно більші і значущі ніж зроблені скромні висновки.

Ко

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті.

Результати дисертаційної роботи викладено в 35 наукових роботах, з яких 21 стаття у провідних вітчизняних і зарубіжних фахових наукових журналах, рекомендованих ДАК МОН України, та 14 тез доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних наукових конференцій та з'їздів.

Автореферат відображає основний зміст дисертації, добре ілюстрований кольоровими конфокальними мікрофотографіями, структурований згідно з існуючими вимогами.

Недоліки й зауваження щодо змісту дисертаційної роботи.

Незважаючи на достатньо ретельний і відповідний вимогам рівень оформлення дисертації, можна поставити дисертантові запитання:

1. Які основні механізми дії НСК ви можете означити по результатам вашої роботи. –нейропротекторний, протизапальний, стимулюючий НСК чи замісно-інтеграційний..

2. Специфічність описаних вами феноменів - чи інші фетальні клітини, наприклад нирки, селезінки можуть визивати стимуляції регенерації. Чи вивчалось вами кондеційне середовище від культур НСК і які отримані результати.

3. Незрозуміло який спосіб введення нейроклітин найкращий субокціпітальний, внутрішньо мозковий, внутрівенний та терміни введення клітин після інсульту.

3. Зроблена велика наукова робота, яка формулює новий науковий напрямок. Окресліть, будь ласка, його теоретичні та практичні шляхи реалізації

Зроблені зауваження та питання не знижують теоретичної та практичної цінності дисертації, не знижують позитивної оцінки дисертації в цілому, а

також зроблених висновків.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Цупикова Олега Михайловича «Вплив трансплантації стовбурових клітин на процеси регенерації нервової тканини після ішемічного ушкодження головного мозку» є закінченим науковим дослідженням і відповідає спеціальності «патологічна фізіологія». Вона містить раніше незахищені наукові положення та науково обґрунтовані результати, що розв'язують важливу науково-прикладну проблему. За критеріями актуальності, новизни, науково-практичного значення, аргументованості висновків, якості викладення матеріалу і повноти їх оприлюднення у фахових наукових виданнях, робота відповідає вимогам пункту 10 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 №567 (зі змінами), а її виконавець, Цупиков Олег Михайлович, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія.

Офіційний опонент:

Начальник відділу нейроімунології

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова НАМНУ»,

член-кореспондент НАМН України,

доктор медичних наук, професор



М. І. Лісяний

