

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора Шелудченко Вячеслава Михайловича на диссертационную работу Хаценко Евгения Игоревича «Технология подготовки и трансплантации 3D клеточных сфероидов ретинального пигментного эпителия в эксперименте», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.01.07 – глазные болезни и 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

### Актуальность избранной темы

Разрушение пигментного ретинального эпителия всегда осложняет течение целого ряда заболеваний и генетически детерминированных состояний глазного дна. Как правило, это всегда неблагоприятный диагностический признак, и подобные нарушения свидетельствует о предстоящей значительной потере зрительных функций. Одним из таких заболеваний является возрастная макулярная дегенерация (ВМД). ВМД стремительно прогрессирует с увеличением среднего возраста жизни человека и становится наиболее распространенным заболеванием органа зрения среди лиц старше 60 лет. Хотя пигментная деструкция при ВМД не является триггерным механизмом заболевания, попытки реанимировать пигментный слой сетчатки в процессе лечения весьма заманчив. Таким образом, актуальность представленной диссертационной работы не вызывает сомнений.

Существует ряд методик лечения ВМД, обладающих различной степенью эффективности в зависимости от стадии патологического процесса: метаболическая терапия биодобавками, витаминами и полипептидными комплексами; интравитреальное введение anti-VEGF препаратов; фотодинамическая терапия; хирургическое удаление субретинальных неоваскулярных мембран и/или субретинального фиброза; транслокация макулярной зоны. Однако вышеперечисленные методы лечения ВМД не всегда эффективны при давности патологического процесса, могут являться дорогостоящими и сопровождаться рядом серьезных осложнений. Следовательно, вопрос поиска новых способов лечения данного заболевания все еще остается открытым.

Дисфункция ретинального пигментного эпителия (РПЭ) считается первым звеном в патогенезе развития ВМД. Поэтому более 30 лет в ряде ведущих офтальмологических центров по всему миру ведется разработка методик, посвященных трансплантации РПЭ, что позволяет влиять на предполагаемую причину развития данного заболевания. Относительно невысокие клиничко-функциональные результаты после трансплантации РПЭ связаны с диссеминацией клеток по субретинальному пространству и в витреальную полость, травматичностью предлагаемых хирургических техник, а также с эпителиально-мезенхимальной трансформацией (ЭМТ) трансплантатов.

В связи с этим в данной диссертационной работе небезосновательно выдвигается гипотеза о том, что трансплантация РПЭ, культивированного в форме 3D клеточных сфероидов, могла бы решить вышеуказанные проблемы. Общая масса сфероида делает возможным его быстрое оседание в толще жидкости и адгезирование к плоской поверхности с последующим распластыванием и образованием клеточного слоя. Эти условия являются необходимыми для профилактики диссеминации трансплантатов. Возможность сконструировать сфероиды диаметра менее 100 мкм могла бы позволить инъецировать их в субретинальное пространство используя канюли минимального диаметра, сохранив при этом микроинвазивность оперативного вмешательства. Также характер межклеточных взаимодействий внутри сфероида, присущий нативным тканям, позволяет преодолеть явление ЭМТ.

Учитывая, что трансплантация 3D сфероидов РПЭ требует проведения доклинических исследований, в офтальмологии традиционно проводимых кроликах, целью данного исследования явилась разработка технологии предоперационной подготовки и техники трансплантации 3D клеточных сфероидов аллогенного ретинального пигментного эпителия в опыте на животных (кролики). Вышеуказанная цель исследования была достигнута посредством последовательного решения 6 задач.

### **Оформление диссертации и оценка ее содержания**

Диссертация построена в классическом стиле, грамотно изложена на 141 странице машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, 3 главы результатов собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы. Работа содержит 38 рисунков и 14 таблиц. Список литературы содержит 140 источников литературы, из которых 19 отечественные и 121 зарубежный.

Во **введении** автор кратко обосновывает актуальность выбранной темы, формулирует цель и задачи исследования, научную новизну и практическую значимость работы. Здесь же диссертант сообщает об апробации основных положений диссертации, ее структуре и объеме, публикациях, а также положениях, выносимых на защиту.

**В обзоре литературы** диссертант анализирует имеющиеся сведения в отечественной и зарубежной научной литературе, посвященные функциям РПЭ и его роли в патогенезе развития ВМД, подробно описывает методики лечения данного заболевания. Крайне детально написан раздел, описывающий историю развития трансплантации РПЭ с описанием видов трансплантатов и методик их субретинальной доставки. Обоснована актуальность и необходимость в разработке нового вида трансплантата РПЭ и модификации хирургической техники его трансплантации. Описывается новый вид трансплантата РПЭ, а именно 3D клеточный сфероид, и объясняются его преимущества над имеющимися на сегодня трансплантатами РПЭ.

**Во второй главе** автором традиционно описываются материалы и методы исследования, приведено их подробное описание *in vitro* и *in vivo* с указанием использованного в работе оборудования и расходных материалов. Диссертантом подробно изложена модифицированная техника выделения донорского РПЭ с последующей предоперационной подготовкой методом трехмерного клеточного культивирования с конструированием 3D клеточных сфероидов. Автором также разработан модифицированный состав

питательной среды для получения большего количества клеток РПЭ за меньший промежуток времени. Также во второй главе соискателем представлены методы послеоперационного контроля за экспериментальными животными с указанием сроков наблюдения и описана методика получения гистологических срезов внутриглазных оболочек кроликов.

**В третьей главе** диссертантом приводятся результаты исследования *in vitro*. Автором было показано, что модифицированный состав питательной среды достоверно способствует ускорению митоза клеток РПЭ и не способствует их ЭМТ. Иммуноцитохимическими методами доказано, что трехмерное культивирование позволяет сохранить клеточный фенотип РПЭ как при нормотермическом культивировании, так и после краткосрочной гипотермической консервации, что является необходимым условием в случае необходимости транспортировки трансплантатов. Полученные данные измерения диаметра сфероидов ( $88,8 \pm 9,2$  мкм) подтвердили возможность их субретинальной трансплантации через канюли минимального диаметра. Было показано, что на плоской поверхности 3D сфероиды РПЭ проявляют адгезию и спрединг, т.е. расплывание с образованием клеточного слоя, это необходимые условия для приживания клеточных трансплантатов и профилактики их диссеминации. Полученные результаты исследований *in vitro* позволили автору перейти к следующему этапу работы – проведению серии экспериментов на кроликах.

**В четвертой главе** соискателем описывается разработанная техника трансплантации 3D сфероидов РПЭ, выполненная на 20 глазах 20 кроликов, разделенных на 2 равные опытные группы в зависимости от количества трансплантируемых сфероидов. Экспериментальным животным проводили микроинвазивную 25G витрэктомию, выполняли ретинопунктуру в парацентральных отделах сетчатки и субретинально вводили трансплантаты – 81 сфероид кроликам из 1-й опытной группы и 162 сфероида кроликам из 2-й опытной группы. В контрольную группу также вошло 10 животных, которым проводили микроинвазивную витрэктомию, ретинопунктуру в

парацентральных отделах сетчатки и субретинально инъецировали 50 мкл физиологического раствора. Во всех группах операции завершали аспирацией жидкости из витреальной полости с последующей тампонадой воздухом и наложение швов на склеротомические разрезы. Следует отметить, что разработанная хирургическая техника является одноэтапной, а также не требует проведения эндолазеркоагуляции сетчатки вокруг ретинопунктурного отверстия ввиду его малого диаметра. На предложенную хирургическую технику трансплантации РПЭ получен патент РФ на изобретение №2704094 от 22.08.2019. Также в данной глава приведены результаты гистологического исследования, на микроскопическом уровне подтверждающие, что 3D сфероиды РПЭ, трансплантируемые субретинально предложенным способом являются жизнеспособными, так как адгезируются к нативному РПЭ кроликов-реципиентов и по мере увеличения сроков наблюдения распластываются, что способствует образованию нового клеточного слоя РПЭ. Данные гистологического исследования подтвердили эффективность и безопасность трансплантации РПЭ в форме многоклеточных 3D сфероидов.

**В пятой главе** диссертантом посредством биомикроскопии, офтальмоскопии, ультразвукового В-сканирования, электроретинографии и оптической когерентной томографии была показана эффективность предложенного способа трансплантации РПЭ в форме 3D клеточных сфероидов, а также доказано, что такие осложнения, как локальная плоская отслойка сетчатки и отек сетчатки в зоне оперативного вмешательства, являются биологически безопасными и обратимыми.

В главе **Заключение** отражены наиболее значимые моменты диссертационного исследования, полученные результаты проанализированы и сопоставлены с данными мировой литературы.

**Выводы** диссертации полностью обоснованы фактическим материалом исследований и логически вытекают из содержания диссертации.

**Практические рекомендации** четко изложены, согласуются с выводами и материалами диссертационного исследования. Они могут быть использованы для дальнейших экспериментальных исследований с целью внедрения в клиническую практику для лечения пациентов с ВМД, не поддающихся традиционным методикам лечения.

Нельзя не отметить, что автор принимал непосредственное участие на всех этапах эксперимента *in vitro* и *in vivo*.

#### **Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Диссертационная работа построена логично. Методологически верно определены цель и задачи исследования. Диссертация выполнена на достаточном количестве экспериментального материала с применением современных лабораторных, клиничко-диагностических и гистологических методов исследований. Анализ данных подтверждает достоверность исследования, обоснованность и аргументированность выносимых на защиту положений, выводов и практических рекомендаций, имеющих несомненное практическое значение для клинической и фундаментальной офтальмологии.

Автореферат, опубликованные 5 научных работ, включая 3 публикации в журналах, рецензируемых ВАК РФ, и 1 патент РФ на изобретение полностью отражают содержание диссертационной работы. Материалы диссертации достаточно полно были представлены на 4 Отечественных офтальмологических конференциях.

#### **Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Научная новизна исследования не вызывает сомнений.

В представленной диссертационной работе впервые показана возможность создания жизнеспособных трансплантатов в виде 3D клеточных сфероидов необходимого диаметра с заданным количеством клеток из аллогенного РПЭ кроликов, доказано, что трехмерное культивирование позволяет сохранить клеточный фенотип кроличьего РПЭ.

Впервые разработана одноэтапная микроинвазивная техника субретинальной трансплантации РПЭ в форме 3D клеточных сфероидов на глазах кроликов, позволяющая проводить оперативное вмешательство с минимальной травматизацией клеточных трансплантатов и тканей глаз реципиентов.

Впервые клиническими, морфологическими и функциональными методами исследований доказаны эффективность и безопасность предложенной технологии трансплантации РПЭ в форме 3D сфероидов.

#### **Значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Разработанная технология выделения, культивирования и конструирования 3D сфероидов РПЭ методом трехмерного культивирования является оптимальной экспериментальной моделью и позволяет использовать ее на других животных. Разработанная микрохирургическая техника в эксперименте на кроликах позволяет безопасно доставлять клеточные трансплантаты РПЭ в субретинальное пространство и в дальнейшем может быть применима для оперативного вмешательства на глазах человека.

#### **Замечания**

Все замечания были учтены автором в процессе рецензирования диссертационной работы. Принципиальных замечаний нет.

#### **Заключение**

Диссертационная работа Хаценко Евгения Игоревича «Технология подготовки и трансплантации 3D клеточных сфероидов ретинального пигментного эпителия в эксперименте» является завершённым научно-квалификационным трудом, в котором содержится новое решение актуальной задачи для офтальмологии, а именно, повышение эффективности трансплантации ретинального пигментного эпителия.

По своей актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований и значимости полученных результатов работа Хаценко Е.И. полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке

присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013г., предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.01.07 – глазные болезни и 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы, а ее автор заслуживает присвоения искомой степени.

Главный научный сотрудник отдела  
патологии сетчатки и зрительного нерва  
ФГБНУ «НИИГБ»,  
доктор медицинских наук, профессор



Шелудченко В.М.

«20» сентября 2020 г.

Подпись д.м.н., профессора Шелудченко В.М. заверяю  
Ученый секретарь ФГБНУ «НИИГБ»,  
доктор медицинских наук



Иванов М.Н.

Юридический и почтовый адрес: Россия, 119021, Москва, ул. Россолимо 11А

Телефон: +7 (499) 248-04-69

Сайт в интернете: niigb.ru

E-mail: info@eyeacademy.ru