

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

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

Актуальность темы диссертации

На сегодня возрастная макулярная дегенерация (ВМД) является одним из наиболее распространенных заболеваний органа зрения среди лиц пожилого возраста. Традиционные методики лечения данного заболевания не всегда приводят к улучшению зрительных функций, а также достаточно часто сопровождаются осложнениями и рецидивированием заболевания. Следовательно, вопрос разработки новых методик лечения ВМД является актуальным.

Считается, что первым звеном в патогенезе развития ВМД является дисфункция ретинального пигментного эпителия (РПЭ). Поэтому сегодня, на стыке фундаментальной и клинической офтальмологии, находятся методики субретинальной трансплантации РПЭ.

Несовершенство предлагаемых методов трансплантации РПЭ связано с травматичностью оперативного вмешательства, высоким риском осложнений и эпителиально-мезенхимальной трансформацией (ЭМТ) трансплантатов. Все эти недостатки являются причинами низких анатомо-функциональных результатов после проведенного хирургического вмешательства. Следовательно, вопросы выбора вида оптимального трансплантата РПЭ и его способа субретинальной трансплантации являются актуальными.

В связи с этим предполагается, что трансплантация РПЭ в форме 3D сфероидов могла бы помочь сохранить клеточный фенотип трансплантатов,

снизить риск их диссеминации, и, при этом, сохранить микроинвазивность оперативного вмешательства.

В связи с необходимостью проведения доклинических исследований целью данной работы явилась разработка технологии предоперационной подготовки и техники трансплантации 3D клеточных сфероидов аллогенного ретинального пигментного эпителия в опыте на животных (кролики).

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

Диссертационная работа построена логично и последовательно. Методологически верно определены задачи исследования, решение которых направлено на достижение цели диссертации. Работа выполнена с применением современных лабораторных и клинико-диагностических методов исследований на достаточном количестве экспериментального материала.

Анализ полученных результатов подтверждает достоверность исследований, обоснованность и аргументированность положений, выносимых на защиту, выводов и практических рекомендаций, имеющих несомненное практическое значение для фундаментальной и клинической офтальмологии.

Опубликованные по теме диссертационного исследования 5 научных работ, из которых 3 в журналах, рецензируемых ВАК РФ, 1 патент РФ на изобретение и автореферат полностью отражают содержание диссертационной работы. Материалы диссертации были представлены на 4 ведущих российских офтальмологических конференциях.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Представленная диссертационная работа обладает несомненной научной новизной для экспериментальной и клинической офтальмологии.

Автором впервые показана возможность создания жизнеспособных 3D клеточных сфероидов из РПЭ кроликов определенного диаметра в

зависимости от количества клеток, а также, с помощью иммуоцитохимических исследований доказано, что трехмерное культивирование позволяет сохранить клеточный фенотип кроличьего РПЭ и преодолеть явление ЭМТ.

Впервые на глазах кроликов разработана хирургическая техника трансплантации РПЭ в форме 3D клеточных сфероидов, позволяющая доставлять клеточные трансплантаты в субретинальное пространство одноэтапно и с минимальной травматизацией внутриглазных структур реципиентов.

Впервые с помощью клинических, морфологических и функциональных методов исследований доказаны эффективность и безопасность разработанной техники трансплантации 3D сфероидов РПЭ.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Разработанная технология выделения и культивирования РПЭ с последующим конструированием 3D сфероидов методом трехмерного культивирования для дальнейшей субретинальной трансплантации является оптимальной экспериментальной моделью и позволяет использовать ее на других животных, а также в дальнейшем может быть применима для оперативного вмешательства на глазах человека.

Оформление диссертации и оценка ее содержания

Диссертация построена в традиционном стиле, изложена грамотным литературным языком на 141 странице машинописного текста и включает в себя: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, 3 главы, посвященные результатам собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы, включающий 140 источников литературы, из которых 19 отечественные и 121 зарубежный. Работа иллюстрирована 38 рисунками и содержит 14 таблиц.

Во **введении** диссертант аргументированно разъясняет актуальность выбранной темы исследования, формулирует цель и задачи исследования, научную новизну и практическую значимость работы, а также сообщает об

апробации основных положений диссертации, ее структуре и объеме, публикациях и положениях, выносимых на защиту.

Обзор литературы написан крайне подробно и включает в себя разделы, посвященные функциям РПЭ и его значению в патогенезе развития ВМД, а также методики лечения данного заболевания и мировую историю развития трансплантации РПЭ с детальными описанием видов трансплантатов и способов их доставки в субретинальное пространство. Автором исчерпывающе проанализированы преимущества и недостатки имеющихся на сегодня методик трансплантации РПЭ. После прочтения обзора литературы не остается сомнений, что вопросы о выборе наиболее подходящего трансплантата РПЭ и способа его микроинвазивной трансплантации являются открытыми и актуальными. В данной главе также развернуто описана такая форма трансплантата, как многоклеточный 3D сфероид, разъяснены его свойства и преимущества, позволяющие преодолеть явления ЭМТ и спонтанной диссеминации.

Во второй главе представлены материалы и методы диссертационного исследования, приведено лабораторное оборудование и расходные материалы, использованные для работы с клеточными культурами, описана разработанная модифицированная техника выделения кроличьего РПЭ с последующим конструированием 3D сфероидов методом трехмерного клеточного культивирования с использованием неадгезивных агарозных планшетов. В связи с тем, что клетки РПЭ обладают слабой митотической активностью, на данном этапе работы автором также был разработан новый состав питательной среды для первичного 2D культивирования РПЭ с целью получения большего количества клеток более короткой отрезок времени. Также в данной главе описаны клинические, морфологические и функциональные методы исследований, использованные для дооперационного исследования кроликов и в послеоперационном периоде.

В третьей главе автор докладывает о результатах фундаментальной части диссертационного исследования. Диссертантом было доказано, что

состав питательной среды с удвоенным количеством ростовых факторов способствует получению значительно большего количества клеток РПЭ, не оказывая негативного влияния на их фенотип. С помощью иммунофенотипического анализа было доказано, что 3D культивирование способствует сохранению клеточного фенотипа РПЭ при нормотермическом культивировании и после краткосрочной гипотермической консервации. Также на данном этапе было показано, 3D сфероиды РПЭ, адгезируясь к плоской поверхности, распластаются и образуют клеточный монослой, что необходимо для снижения риска их диссеминации. Результаты измерения диаметра сфероидов подтвердили возможность их трансплантации через канюли диаметра 39G. Полученные результаты фундаментального этапа исследования позволили диссертанту перейти к следующему этапу работы – проведению серии экспериментов *in vivo*.

В четвертой главе приводится описание разработанной техники трансплантации 3D сфероидов РПЭ. Оперативное вмешательство проводили 30 кроликам, разделенных на 3 равные группы – опытную и контрольную. Всем животным проводили микроинвазивную витрэктомию. Кроликам из 1-й и 2-й опытных групп субретинально вводили 3D сфероиды РПЭ в количестве 81 и 162 соответственно. Кроликам из контрольной группы субретинально вводили 50 мкл стерильного физиологического раствора. Во всех случаях операции завершались тампонадой витреальной полости воздухом, необходимости в проведении эндолазеркоагуляции сетчатки в зоне формирования ретинопунктурного отверстия не возникло ни в одном случае. В данной главе также представлены результаты световой микроскопии гистологических срезов внутриглазных оболочек кроликов исследования, подтверждающие эффективность и безопасность трансплантации 3D сфероидов РПЭ.

Пятая глава посвящена результатам клинических наблюдений за экспериментальными животными. С помощью морфологических методов исследований показано, что предложенная хирургическая техника

трансплантации РПЭ в форме 3D сфероидов является эффективной и безопасной, т.к. позволяет доставлять клеточные трансплантаты в субретинальное пространство при минимальных и обратимых изменениях со стороны внутриглазных оболочек.

В **Заключении** освещены наиболее важные аспекты диссертации, полученные результаты исследований подвергнуты анализу и сопоставлены с данными мировой офтальмологической литературы.

Выводы и практические рекомендации сформулированы логично, основаны на результатах проведенного исследования, подчеркивают и конкретизируют наиболее существенные положения работы.

Замечания

Принципиальных замечаний по представленной диссертационной работе не имею.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным положением о порядке присуждения ученых степеней

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.

Заместитель заведующего лабораторией
химических и биотехнологических синтезов
ФГАО УВО «МФТИ»,

доктор медицинских наук

«27» сентября 2020 г.

Темнов А.А.

«ЗАВЕРЯЮ»

Ученый секретарь ФГАО УВО «МФТИ»

кандидат физико-математических наук



Скалько Ю.И.

Юридический и почтовый адрес: Россия, 141701, Московская область,
г. Долгопрудный, Институтский переулок 9

Телефон: +7 (495) 408-45-54

Сайт в интернете: mipt.ru

E-mail: info@mipt.ru