



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУ «НМИЦ ГБ
им. Гельмгольца» Минздрава России,
д-м.н., академик РАН
В.В. Нероев

« 17 » *мกราคม* 2020 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕГО УЧРЕЖДЕНИЯ

о научно-практической значимости диссертационной работы

Хаценко Евгения Игоревича

«Технология подготовки и трансплантации 3D клеточных сфероидов
ретиального пигментного эпителия в эксперименте»

по специальностям 14.01.07 – глазные болезни и

14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

Актуальность темы диссертации

Наиболее тяжелым, социально и эпидемиологически значимым офтальмологическим заболеванием является возрастная макулярная дегенерация (ВМД). Патогенез развития данного заболевания связан с нарушением транспортной и фагоцитарной функций ретиального пигментного эпителия (РПЭ) вследствие естественного процесса старения организма и различных триггерных факторов.

Укоренившиеся методики лечения ВМД (консервативная терапия, интравитреальное введение anti-VEGF препаратов, фотодинамическая терапия, удаление фибро-вазкулярных мембран и др.) не всегда приводят к существенному улучшению зрительных функций, могут являться дорогостоящими, иногда и вовсе направлены на сохранение остаточного зрения, а также никогда не исключают риска рецидивирования заболевания. Поэтому актуальна разработка методов трансплантации РПЭ, позволяющих влиять на первичное звено патогенеза развития ВМД, что предполагает использование фундаментальных и клинических методов исследования

Однако предлагаемые методики трансплантации РПЭ имеют недостатки, связанные с диссеминацией трансплантатов, их эпителиально-мезенхимальной трансформацией (ЭМТ) и травматичностью предлагаемых хирургических техник. Все эти причины могут приводить к невысоким анатомо-функциональным результатам после проведенного хирургического вмешательства.

В представленной диссертации предлагается метод трансплантации РПЭ, культивированного в форме 3D клеточных сфероидов, который может быть полезным в решении вышеуказанных проблем. Известно, что 3D культивирование позволяет сохранить клеточный фенотип РПЭ и позволяет преодолеть явление ЭМТ. Клеточные сфероиды способны к адгезии спредингу на плоской поверхности – это позволяет снизить вероятность диссеминации трансплантатов. Диаметр сфероидов позволяет инъецировать их в субретинальное пространство через канюли минимального диаметра с целью минимизации травматизации внутриглазных структур.

Для разработки метода трансплантации РПЭ в форме 3D сфероидов необходимо проведение доклинических исследований. В диссертационной работе Хаценко Евгения Игоревича поставлена цель – разработать технологию предоперационной подготовки и технику трансплантации 3D клеточных сфероидов аллогенного РПЭ в экспериментальных исследованиях, в которых задействованы кролики. Цель исследования достигается посредством решения 6 задач, которые включают разработку методов конструирования клеточных сфероидов РПЭ, трансплантации их, оценку эффективности и безопасности предлагаемого метода.

Связь с планом научных исследований

Диссертация Хаценко Е.И. на тему «Технология подготовки и трансплантации 3D клеточных сфероидов ретинального пигментного эпителия в эксперименте» выполнена в соответствии с планами научно-исследовательских работ ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Работа соответствует специальностям 14.01.07 – глазные болезни и 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Выполненные автором экспериментальные исследования привели к ряду конкретных заключений:

1. Впервые показана возможность создания жизнеспособных трансплантатов 3D клеточных сфероидов необходимого диаметра с заданным количеством клеток из аллогенного РПЭ кроликов, а также доказано, что трехмерное культивирование позволяет сохранить клеточный фенотип кроличьего РПЭ.
2. Впервые разработана микроинвазивная техника субретинальной трансплантации РПЭ в форме 3D клеточных сфероидов на глазах кроликов,

что позволяет проводить оперативное вмешательство одноэтапно и с минимальной травматизацией клеточных трансплантатов и тканей глаз реципиентов.

3. Впервые с помощью гистологического исследования показано, что 3D сфероиды РПЭ, трансплантируемые субретинально, быстро адгезируются и распластаются на нативном РПЭ реципиентов, образуя новый клеточный слой РПЭ не оказывая негативного влияния на состояние внутриглазных оболочек – сетчатку и хориоидею.

4. Впервые доказана безопасность разработанной техники трансплантации 3D сфероидов РПЭ посредством биомикроскопии, офтальмоскопии и ультразвукового В-сканирования.

5. Впервые посредством оптической когерентной томографии показано, что 3D сфероиды РПЭ, трансплантируемые по предложенной технологии, доставляются в субретинальное пространство, а морфологические изменения состояния сетчатки в раннем послеоперационном периоде являются незначительными и обратимыми.

6. Впервые посредством электроретинографии доказано, что полное восстановление функционального состояния нейросенсорной сетчатки у кроликов после трансплантации 3D сфероидов РПЭ происходит на 20-е – 30-е сутки после проведения оперативного вмешательства.

Значимость полученных результатов для науки и практики

1. Разработанная технология выделения, культивирования и конструирования 3D трансплантатов РПЭ в виде сфероидов методом трехмерного культивирования позволяет проводить трансплантацию РПЭ у кроликов и, возможно, у других животных.

2. Разработанная микрохирургическая техника в эксперименте на кроликах, заключающаяся в проведении микроинвазивной 25G витрэктомии, ретинопунктуры и субретинальном введении 3D сфероидов РПЭ позволяет безопасно доставлять клеточные трансплантаты в субретинальное пространство и может быть применима в опытах по трансплантации на разных видах животных, что может служить основанием для проведения дальнейших экспериментальных и клинических исследований.

Полученные результаты могут быть использованы в офтальмологических учреждениях витреоретинальными хирургами, клеточными биологами и научными работниками, занимающимися вопросами фундаментальной офтальмологии.

Достоверность выводов и положений, выносимых на защиту, личный вклад автора

Фундаментальная часть исследования *in vitro* выполнена на базе ЦФПМБП ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России под руководством заведующего Центром, д.м.н., профессора, академика РАЕН Борзенка С.А., при непосредственном участии заведующей Глазным тканевым банком, к.м.н. Хубецовой М.Х. и научного сотрудника, к.б.н. Островского Д.С.

Экспериментальные исследования *in vivo* выполнены на базе Калужского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (директор – д.м.н. Терещенко А.В.) под руководством заместителя директора по научной работе, к.м.н. Трифаненковой И.Г. и, при непосредственном участии заведующего операционным блоком, к.м.н. Плахотного М.А. и заведующей диагностическим отделением №2, к.м.н. Ерохиной Е.В.

Гистологические исследования выполнены на базе Лаборатории патологической анатомии и гистологии глаза ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России под руководством заведующей лабораторией, к.м.н. Шацких А.В.

Все исследования проведены тщательно с использованием современной аппаратуры, обработка полученных результатов выполнена грамотно и не вызывает сомнений.

Автор принимал непосредственное участие в постановке задач исследования и разработке концепции экспериментального исследования, осуществлял сбор материала для исследования, участвовал и самостоятельно проводил экспериментальные исследования *in vitro* и *in vivo*. Автором самостоятельно сформирована база данных, проведена статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

Рекомендации по использованию диссертационной работы в практике

1. Для получения однородной суспензии клеток РПЭ из трупного кроличьего глаза без ее контаминации клеточными и экстрацеллюлярными компонентами сетчатой оболочки и стекловидного тела предложена частично модифицированная базисная методика препарирования глазного яблока. Производится выкраивание корнео-склерального диска трепаном 7 мм, рассечение склеры тремя меридиональными разрезами спереди назад длиной $2/3$ вдоль глазного яблока, отгибание лепестков склеры с

последующим удалением, нанесение трех разрезов на хориоидально-пигментный комплекс. При этом первый круговой разрез выполняется на расстоянии 1 мм от зубчатой линии, а первый меридиональный разрез – в любом меридиане в направлении от первого разреза спереди назад к культе диска зрительного нерва; второй круговой разрез – на расстоянии 1 мм от культи зрительного нерва с последующим отделением хориоидально-пигментного комплекса от нейросенсорной сетчатки пинцетом и укладыванием на дно стерильной чашки Петри клетками ретинального пигментного эпителия вверх и заливкой 2 мл 0,25%-го раствора трипсина.

2. Для конструирования клеточных трансплантатов в виде 3D сфероидов из РПЭ предложено использовать клеточные 2D культуры 1-го пассажа с последующим перенесением в 81-луночные агарозные планшеты и инкубированием при стандартных условиях (температура 37°C, 5% концентрация CO₂, 100% влажность) в течение 7-и суток. Оптимальным посевным количеством клеток ретинального пигментного эпителия на один сфероид следует считать 1000 клеток.

3. Для трансплантации 3D сфероидов РПЭ рекомендуется проводить микроинвазивную трехпортовую 25G витрэктомия через pars plana, ретинопунктуру канюлей с острым кончиком калибра 39G с последующим введением клеточных культур под сетчатку, используя устройство для субретинальных инъекций, подключаемое к аппарату для витреоретинальной хирургии. Оперативное вмешательство следует завершать аспирацией жидкости из витреальной полости с последующей заменой на стерильный воздух и наложением швов на склеральные и конъюнктивальные разрезы.

Протокол послеоперационного фармакологического пособия является стандартным после витреоретинальных операций и включает в себя местную антибактериальную и противовоспалительную терапию в течение 2-х недель.

Апробация работы и публикации

Результаты исследования внедрены в практику в Центре фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем (ЦФПМБП) ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, на их основе проводятся доклинические испытания в Головной организации, а также в Калужском, Краснодарском и Санкт-Петербургском филиалах ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, а также включены в цикл лекций по основам трансплантологии и регенеративной медицины для клинических ординаторов, аспирантов и курсантов в Научно-педагогическом центре ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.

Федорова» Минздрава России и кафедры Глазных болезней Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова.

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, из них 3 в журналах, рекомендуемых ВАК РФ. Получен патент РФ на изобретение № 2704094 от 22.08.2019.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на XII Всероссийской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы офтальмологии» (г. Москва, 20 июня 2018 г.), на научно-клинической конференции ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (г. Москва, 14 декабря 2018 г.), на XVII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии» (г. Сочи, 22 марта 2019 г.), на XVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения» (г. Москва, 27 июня 2019 г.).

Заключение

Диссертационная работа Хаценко Евгения Игоревича «Технология подготовки и трансплантации 3D клеточных сфероидов ретинального пигментного эпителия в эксперименте», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является завершенным научно-квалификационным трудом, выполненном на высоком научном и методологическом уровне. В работе содержится решение актуальной задачи офтальмологии, а именно разработана технология предоперационной подготовки ретинального эпителия с последующей субретинальной трансплантацией в эксперименте, являющаяся перспективной для дальнейших экспериментальных исследований с целью внедрения в клиническую практику для лечения тяжелых форм возрастной макулярной дегенерации, не поддающихся традиционным методикам лечения.

Диссертационная работа Хаценко Е.И. полностью соответствует требованиям п. 9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., 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 ученой степени.

Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на заседании Экспертной комиссии Учёного совета
Протокол № 1 от «14» *сентября* 2020 г.

Ведущий научный сотрудник отдела
патологии сетчатки и зрительного нерва,
кандидат мед.наук

Зайцева О.В.

Начальник отдела патофизиологии и биохимии,
доктор биологических наук, проф.

Чеснокова Н.Б.

«Заверяю»
Ученый секретарь Центра,
кандидат медицинских наук



Орлова Е.Н.

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Юридический и почтовый адрес: 105062, Москва, ул. Садовая-Черногрозская 14/19

Тел.: +7 (495) 625-87-73

Сайт: helmholtzeyeinstitute.ru

E-mail: kanc@igb.ru