

ОТЗЫВ

официального оппонента
на диссертационную работу

Ерофеевой Анны-Марии Вадимовны

«Роль каннабиноидных рецепторов в антиноцицептивном действии
мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при экспериментальной
периферической нейропатии»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 14.03.03 – патологическая физиология

Соответствие диссертации специальности и отрасли науки, по которой она представлена к защите

Тема диссертационной работы Ерофеевой А.-М.В. направлена на выявление участия каннабиноидных рецепторов первого и второго типа в реализации эффектов мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в условиях периферической нейропатии в эксперименте. В процессе выполнения диссертационного исследования в экспериментах на крысах осуществлено моделирование периферической нейропатии путем иссечения участка седалищного нерва крыс с целью выявления динамики изменений ноцицептивной чувствительности, походки и структурно-функциональных нарушений седалищного нерва крыс, что соответствует п. 1 области исследования паспорта специальности 14.03.03 – патологическая физиология, утверждённого Приказом ВАК Республики Беларусь от 23 апреля 2018 г. № 116. В данной работе изучены механизмы коррекции нейропатической боли и восстановления структурно-функциональных нарушений с использованием мезенхимальных стволовых клеток после экспериментального повреждения седалищного нерва, что соответствует п. 4 и п. 5 области исследования паспорта специальности 14.03.03 – патологическая физиология. В совокупности, по актуальности диссертационной работы, поставленным цели и задачам, исследуемому объекту и предмету, использованным методологическим подходам, выносимым на защиту положениям и результатам исследования, диссертация соответствует специальности 14.03.03 – патологическая физиология и отрасли – биологические науки.

Актуальность темы диссертации

Эффективное купирование нейропатической боли представляет собой злободневную проблему, поскольку данный вид боли является трудно излечимым. Доступные в настоящее время лекарственные средства и немедикаментозные методы терапии нейропатической боли направлены главным образом на облегчение симптомов, но не на патогенетические механизмы, лежащие в основе заболевания. Необходимость в разработке новых подходов подтверждается эпидемиологическими данными: распространенность нейропатической боли среди взрослого населения

составляет от 7-8% и может достигать 20% [M Liu et al., 2020], а более чем у половины пациентов с нейропатической болью не удается добиться адекватного облегчения боли [Basbaum A. I. et al., 2016].

В последние годы появляется все больше исследований по купированию нейропатической боли мезенхимальными стволовыми клетками, которые показали их огромный терапевтический потенциал. Изучение механизмов, лежащих в основе обезболивания стволовыми клетками хронического болевого синдрома при повреждении периферических нервов, является актуальной задачей текущих и будущих экспериментальных исследований, без которых внедрение клеточной терапии нейропатической боли в клиническую практику не представляется возможной.

В диссертационной работе А.-М.В. Ерофеевой уделено внимание решению задачи по раскрытию одного из вероятных механизмов, лежащих в основе ослабления нейропатической боли стволовыми клетками – активации эндоканнабиноидной системы организма. Данная сигнальная система не только регулирует поступление ноцицептивных сигналов по проводящим путям нервной системы, но и выполняет множество других функций, в том числе участвует в реализации биологической активности стволовых клеток. Следует подчеркнуть, что доказательства участия каннабиноидных рецепторов в регуляции жизнедеятельности культуры мезенхимальных стволовых клеток появилась в литературе относительно недавно.

Выяснение роли каннабиноидных рецепторов в вызываемом стволовыми клетками анальгетическом эффекте в условиях нейропатической боли в эксперименте поможет не только расширить представление о возможности реализации терапевтического потенциала стволовых клеток, но и определить возможности усиления эффективности клеточной терапии, воздействуя на компоненты эндоканнабиноидной системы.

Таким образом, диссертационная работа Ерофеевой А.-М.В. является актуальным научным исследованием, которое имеет как фундаментальное, так и прикладное значение.

Степень новизны результатов, полученных в диссертации и научных положений, выносимых на защиту

В диссертационной работе Ерофеевой А.-М.В. получен ряд принципиально новых научных результатов.

В экспериментальной модели периферической нейропатии показано анальгетическое действия однократной локальной инъекции мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани, выраженное не только в ослаблении механической и термической гипералгезии, но и в устранении нарушений походки, связанных с хроническим болевым синдромом. Полученные результаты указывают на способность МСК не только нормализовать повышенный болевой порог, но и улучшать двигательную функцию конечности.

Установлен новый факт – усиление антиноцицептивного действия мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при фармакологической стимуляции их мембранных CB1 рецепторов, в отличие от CB1 рецепторов, экспрессируемых в периферических тканях, что может лечь в основу метода усиления терапевтических свойств стволовых клеток.

Впервые определено участие каннабиноидных рецепторов CB2, локализованных как в области поврежденных тканей, так и на мезенхимальных стволовых клетках жировой ткани, в реализации антиноцицептивного действия последних после повреждения седалищного нерва крыс.

Впервые идентифицированы структурно-функциональные изменения в поврежденном седалищном нерве после трансплантации мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на фоне активации и блокады каннабиноидных рецепторов CB1 и CB2, которые указывают на роль этих рецепторов в механизме стимулирующего эффекта мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на регенераторные процессы в поврежденном нерве.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения и выводы представленной диссертационной работы обоснованы достаточным объемом выборки животных (n=124), разделенных на группы с соблюдением основных принципов биоэтики и концепции трёх R. Длительность экспериментальных серий (90 суток) позволила максимально оценить в динамике изменения антиноцицептивных и протекторных эффектов мезенхимальных стволовых клеток при активации и блокаде каннабиноидных рецепторов.

В работе использованы научно обоснованные методики (инструментальные – метод алгометрии, количественный анализ походки с использованием специализированного аппаратно-программного комплекса; гистологические, морфометрические методы). Графическая обработка данных выполнена в специализированной программе OriginPro. Статистический анализ данных проведен с использованием статистической программы Statistica, использованы параметрические и непараметрические критерии сравнений, исходя из нормальности распределения значений. В совокупности, все научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, а также рекомендации соответствуют цели и поставленным задачам, изложены логично, обоснованы адекватным использованием методов исследования и статистического анализа.

Научная, практическая, экономическая и социальная значимость диссертации с указанием рекомендаций по ее использованию

Научная значимость диссертационного исследования Ерофеевой А.-М.В. заключается в установлении роли каннабиноидных рецепторов 1-го и 2-го типа различной локализации в механизме антиноцицептивного, а также

протекторного и репаративного эффектов мезенхимальных стволовых клеток в условиях периферической нейропатии. Полученные данные позволяют углубить понимание о процессах, возникающих в зоне повреждения нерва после трансплантации мезенхимальных стволовых клеток. Результаты исследования предполагают необходимость учёта функциональной активности эндоканнабиноидной системы при изучении эффективности мезенхимальных стволовых клеток при коррекции других патологических процессов и состояний. Научная значимость работы подтверждается соответствием приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности 2021-2025 гг. (п. 2 Перечня).

Практическая значимость диссертационной работы определяется тем, что результаты исследования могут быть использованы для разработки методики предварительной обработки мезенхимальных стволовых клеток агонистами каннабиноидных рецепторов с целью усиления их терапевтического потенциала. Экспериментальные результаты исследования включены в образовательный процесс трех столичных вузов, ведущих подготовку специалистов биологического и медико-биологического профиля, что подтверждено тремя актами внедрения.

Потенциальная экономическая значимость состоит в выявлении возможности оптимизации дозы трансплантации стволовых клеток при предварительной инкубации с лигандами каннабиноидных рецепторов, возможном снижении кратности инъекций.

Опубликованность результатов диссертации в научной печати

Количество опубликованных работ по теме диссертационного исследования включает 31 научную публикацию. Из них: 10 статей в рецензируемых научных журналах, соответствующих части первой пункта 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (общий объем – 8,24 авторского листа), включающих 1 статью в зарубежном научном журнале на английском языке; 7 статей в сборниках научных трудов и материалах конференций (1,77 авторского листа); 14 тезисов докладов (1,16 авторского листа). Общий объем опубликованных материалов по теме диссертации составляет 11,17 авторского листа. Личный вклад соискателя – 79%. Указанные публикации отражают содержание диссертации и полученные результаты. Исходя из вышеизложенного, объем публикаций и их содержание полностью соответствуют требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК

Рукопись диссертации оформлена согласно Инструкции о порядке оформления диссертации, диссертации в виде научного доклада, автореферата диссертации и публикаций по теме диссертации, утверждённой Постановлением ВАК Республики Беларусь от 28.02.2014 № 3 (в редакции Постановления ВАК Республики Беларусь от 22.08.2022 № 5).

Объем рукописи диссертации составляет 146 страниц текста (основной объем – 96 страниц). Работа имеет все необходимые структурные части: титульный лист, содержание, перечень сокращений, введение, общую характеристику работы, главу с аналитическим обзором литературы, главу с описанием материалов и методов исследования, 3 главы результатов исследований соискателя, главу, посвященную анализу и обсуждению полученных результатов, заключение, включающее основные научные результаты и рекомендации по практическому использованию результатов, библиографический список, список публикаций соискателя учёной степени, приложение. В диссертации содержится 28 рисунков и 7 таблиц. Библиографический список включает 251 использованных источник (44 – на русском языке и 207 – на английском), 31 публикация соискателя.

Содержание автореферата полностью отражает суть представленной диссертации, содержит все необходимые структурные части, и оформлен согласно ранее указанной инструкции.

Замечания и вопросы по диссертации

Замечания

1. При характеристике современных методов лечения нейропатических болей в обзоре литературы не упомянуто широко применяемое лекарственное средство габапентин.

2. Формулировки «внутримышечное введение», «локальное внутримышечное введение» в отношении введения агонистов и антагонистов в область повреждения нервов являются не вполне корректными.

3. Используемые соискателем в работе антагонисты СВ1 рецепторов AM251 и СВ2 рецепторов AM630 являются, строго говоря, не антагонистами, а обратными (инверсными) агонистами, т.е. они не только блокируют взаимодействие рецепторов с лигандами, но и инактивируют те рецепторы, которые уже активированы.

4. Учитывая то, что каннабиноидные рецепторы, в особенности СВ1 рецепторы, широко экспрессируются в мозге, в тексте диссертации следовало бы упомянуть о наличии либо отсутствии существенных изменений поведения экспериментальных животных, которые возможны после введения лигандов этих рецепторов в область повреждения тканей.

5. Утверждение о том, что BDNF является медиатором боли (с. 101), не вполне корректно, правильнее указать, что он способствует формированию нейропатической боли.

6. В обсуждении результатов указывается, что СВ2 рецепторы на поверхности МСК в меньшей степени участвуют в реализации антиноцицептивного эффекта, чем СВ1 рецепторы (с. 112). На мой взгляд, это утверждение спорное; в частности, антагонист СВ2 рецепторов существенно уменьшал антиноцицептивный эффект МСК (рисунок 5.2, с. 87).

Вопросы

1. Чем объяснить уменьшение антиноцицептивного эффекта мезенхимальных стволовых клеток при увеличении их концентрации (с. 31)?
2. Какие параметры походки отражают степень аллодинии?
3. Какие аспекты отражает функциональный седалищный индекс?
4. Как объяснить отсутствие корреляции между параметрами походки (кроме функционального седалищного индекса) и показателями ноцицептивных реакций (с. 59)? Что, в таком случае, является определяющим для изменения походки?
5. Почему использовали МСК 3-го пассажа?
6. Почему в группе животных, получавших МСК, процент повреждённых нервных волокон увеличивается с течением времени (14% на 21-е сутки и 37% на 90-е сутки) (с. 64)?
7. Оценивалась ли ноцицептивная чувствительность в более поздний период после введения анандамида без МСК?
8. Наблюдались ли какие-либо изменения в поведении животных после введения лигандов каннабиноидных рецепторов, в частности, анандамида?
9. Если шванновские клетки способны продуцировать BDNF, который участвует в формировании нейропатической боли, то каким образом они могут вносить вклад в индуцированную введением МСК анальгезию?
10. Что имеется в виду под конгенерами эндогенных каннабиноидов? (с. 101).

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

После изучения текста диссертации Ерофеевой Анны-Марии Вадимовны «Роль каннабиноидных рецепторов в антиноцицептивном действии мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при экспериментальной периферической нейропатии», автореферата диссертации, содержания опубликованных работ по теме и степени апробированности результатов исследования можно сделать вывод, что научная квалификация Ерофеевой А.-М.В. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к соискателям ученой степени кандидата биологических наук. Диссертационная работа А.-М.В. Ерофеевой является законченным, самостоятельно выполненным научным исследованием, которое вносит существенный вклад в патологическую физиологию и смежные с ней науки. Автор диссертационного исследования продемонстрировала навыки поиска и анализа литературных источников по заданной научной теме, умение формулировать цель и задачи научного исследования, анализировать полученные данные и делать на их основе обоснованные выводы. Также она показала навыки статистической обработки полученных в ходе экспериментов результатов с использованием современных параметрических и непараметрических методов.

Вышеуказанные замечания не перечёркивают основные выводы работы, не умаляют её достоинств, они носят в основном рекомендательный характер.

Заключение

Исходя из актуальности темы, использованных методических подходов, новизны и достоверности полученных результатов, их научной и прикладной значимости, обоснованности выводов, диссертационная работа Ерофеевой А.-М.В. «Роль каннабиноидных рецепторов в антиноцицептивном действии мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при экспериментальной периферической нейропатии», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология является завершённым, научным исследованием, которое соответствует требованиям главы 3 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь.

Считаю, что автор диссертации, Ерофеева Анна-Мария Вадимовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по указанной специальности за новые научные результаты, включающие:

- доказательство способности мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при однократном введении, наряду с антиноцицептивным и протекторным эффектами, устранять нарушения походки, связанные с хроническим болевым синдромом и дегенерацией седалищного нерва крыс после его перерезки;

- выявление усиления антиноцицептивного и протекторного эффектов мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при периферической нейропатии после предварительной инкубации их с агонистом СВ₁-рецепторов;

- определение вклада СВ₂-рецепторов на поверхности мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани, а также в области повреждения нерва в механизм антиноцицептивного и протекторного эффектов этих клеток при периферической нейропатии, вызванной перерезкой седалищного нерва;

- установление способности лигандов каннабиноидных СВ₁ и СВ₂ рецепторов оказывать влияние на интенсивность репаративных процессов в поврежденном нерве крыс после трансплантации мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, доцент,
заведующий кафедрой фармакологии
имени профессора М.В. Кораблёва
Гродненского государственного
медицинского университета

Подпись *В.И. Козловский*
Старший инспектор по кадрам отдела кадров
учреждения образования «Гродненский
государственный медицинский университет»
С.В. Захарчук
«06 02 2025»



Ky

В.И. Козловский