

ОТЗЫВ

**официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Беженаря
Виталия Федоровича на диссертационную работу Пекаревой Егении
Олеговны на тему «Клинико-экспериментальное обоснование применения
клеточных технологий после абдоминального родоразрешения»,
представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук
по специальности 3.1.4. - Акушерство и гинекология**

Актуальность темы исследования

Кесарево сечение является одной из самых распространённых акушерских операций. За последние несколько десятилетий частота кесарева сечения в России увеличилась более чем в два раза. В структуре показаний для повторного кесарева сечения рубец на матке занимает 1-е место. Между тем повторная беременность у матерей с рубцами на матке представляет угрозу для здоровья матери и плода. При этом в настоящее время отмечается увеличение частоты как несостоятельных рубцов на матке после кесарева сечения, так и числа связанных с этим патологическим состоянием осложнений. Поэтому в последние годы растёт интерес среди ученых к изучению мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и секреторных продуктов их жизнедеятельности – экзосом и микровезикул. Данные клеточные технологии открывают в настоящее время новые горизонты для их использования в акушерской практике. Экзосомы являются уникальными биологическими субстанциями, поскольку практически лишены иммуногенности, обладают ангиогенным, антифибротическим, антиапоптотическим и противовоспалительным эффектами. К отличительным особенностям секрета следует отнести и наличие выраженного противовоспалительного, антибактериального и регенеративного действия, которые подчас не уступают по своей силе непосредственно МСК. Пока в доступной литературе нет данных о клиническом использовании экзосом для профилактики послеоперационных осложнений после кесарева сечения и улучшения репаративных свойств миометрия. Именно поэтому понимание механизма действия экзосом после их введения в ходе абдоминального родоразрешения представляется крайне важным для изучения

процессов репарации миометрия, как возможного способа снижения частоты последующего кесарева сечения за счет самопроизвольного родоразрешения пациенток с рубцом на матке. Вот почему настоящее исследование чрезвычайно востребовано с научного и клинического ракурсов, т.к. аналогичных исследований в общедоступных источниках не найдено.

Заслуживает особого внимания четко определенный вектор настоящего исследования, а именно его цель: снижение частоты повторного кесарева сечения у женщин с рубцом на матке после абдоминального родоразрешения и профилактика инфекционно-воспалительных осложнений в послеродовом периоде за счет экспериментального обоснования и клинического применения клеточных технологий.

Перспективу достижения поставленной цели определила последовательная цепь из 7 задач, поэтапная реализация которых позволило выполнить диссертационное исследование в избранном курсе.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, содержащихся в диссертации

Репрезентативность диссертационного исследования Е.О. Пекаревой подтверждается на основании анализа экспериментальных данных, полученных от 342 лабораторных животных, которым вводили экзосомы мезенхимальных стромальных клеток пуповинного происхождения, и включением в клиническую часть диссертационного исследования 760 беременных и рожениц с рубцом на матке после кесарева сечения, из которых 60 пациенткам с оперированной маткой после абдоминального родоразрешения впервые в акушерской практике проведено интраоперационное введение экзосом мезенхимальных стромальных клеток пуповинного происхождения.

Основательность диссертационного исследования определил рациональный подход к выбору дизайна исследования, методологии, методов исследования (клиническо-лабораторного, морфологического, статистического), позволяющих в полной мере реализовать все поставленные задачи и достичь цели. Принципиально важен выбор диагностических методик, являющихся рутинными в

учреждениях третьего уровня, но позволяющих верифицировать критерии полноценности рубца миометрия после абдоминального родоразрешения после введения экзосом и без применения клеточных технологий (УЗИ, МРТ, гистероскопия).

Научные положения, выводы и практические рекомендации диссертационного исследования полностью соответствуют представленным данным, логически вытекают из промежуточных резюме. Результаты диссертационного исследования Пекаревой Е.О. обсуждены на конференциях федерального и международного уровней; по мере реализации поставленных задач отражены в печати (опубликовано 27 печатных работ, в том числе 12 статей в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов для публикаций материалов исследования, рекомендованных ВАК РФ, и 3 – в международных изданиях, включенных в систему Web of Science или Scopus).

Научная новизна исследования

Настоящее диссертационное исследование бесспорно характеризуется научной новизной и не вызывает сомнений. Для повышения регенерации тканей в клинической медицине на протяжении 15 лет с успехом используются клеточные технологии. Тем не менее, существуют определенные трудности для их широкого внедрения. Среди многообразия уникальных механизмов действия стволовых клеток заслуживает самого пристального внимания их способность взаимодействия и обмена, как белковым, так и генетическим материалом посредством секреции микровезикул. Экзосомы – биологически активные субстанции – обладают способностью стимулировать пролиферацию клеток, индуцировать миграцию стволовых клеток, улучшать репарацию ткани, а также уменьшать воспаление и боль. В данном диссертационном исследовании в рамках эксперимента впервые была предложена методика введения экзосомы мезенхимальных стромальных клеток (ЭМСК) в маточные рога крыс линии Wag, и впервые предложена методика оценки времени пребывания экзосом в исследуемых тканях, с обязательной оценкой их эффективности как в интактных тканях, так и в области швов миометрия. Опытным путем продемонстрировано нахождение продуктов

секретома в течение 8 суток. Для улучшения репарации тканей и профилактики инфекционно-воспалительных послеродовых осложнений впервые в акушерской практике в клинике проведено интраоперационное введение экзосом мезенхимальных стромальных клеток в область разреза нижнего сегмента с последующим морфологическим подтверждением формирования полноценного рубца миометрия после кесарева сечения в условиях применения клеточных технологий. Это позволило достоверно повысить частоту самопроизвольного родоразрешения у пациенток с рубцом на матке и обосновать целесообразность применения экзосом мезенхимальных стромальных клеток пуповинного происхождения в ходе первого кесарева сечения для последующего самопроизвольного родоразрешения и снижения частоты повторного кесарева сечения.

Научно-практическая значимость работы

Настоящее исследование продемонстрировало эффективность методики интраоперационного введения экзосом мезенхимальных стромальных клеток как для профилактики инфекционно-воспалительных послеродовых осложнений, так и формирования полноценного рубца в эксперименте и в клинике. При исследовании рубцов миометрия и границы между рубцом и миометрием после абдоминального родоразрешения с примененными клеточными технологиями была отмечена меньшая численная плотность нейтрофилов, тучных и дегенерирующих клеток по сравнению с женщинами без экзосомной поддержки. Автором определена стратегия и тактика применения клеточных технологий, включающая интраоперационное введение 500 мкл экзосом мезенхимальных стромальных клеток пуповинного происхождения в область шва нижнего сегмента матки. В ходе исследования определены группы беременных и рожениц с рубцом на матке после кесарева сечения для повышения вероятности самопроизвольного родоразрешения, улучшения перинатальных исходов и снижения частоты послеродовых инфекционно-воспалительных заболеваний.

Для исключения признаков неполноценности рубца на матке после кесарева сечения на этапе предгравидарной подготовки у женщин, планирующих

беременность, автором рекомендовано проведение комплекса инструментального обследований, включающих МРТ, УЗИ и офисную гистероскопию через 6-12 месяцев после предшествующего абдоминального родоразрешения. При анализе течения родов продемонстрировано, что проведение рутинного интранатального УЗИ роженицам с рубцом на матке после кесарева сечения и экзосомной поддержки не является обязательным, поскольку толщина нижнего сегмента у данной категории пациенток не отличается от женщин с интактной маткой. У пациенток с введенными в ходе первого кесарева сечения экзосомами мезенхимальных стромальных клеток, частота самопроизвольного родоразрешения достигла 15/21 (71,4%), что в 8,16 раза больше по сравнению с женщинами из группы ретроспективного анализа. Таким образом, проведенное диссертационное исследование и полученные в результате этого данные достоверно значимо указывают на более высокую эффективность интраоперационного использования клеточных технологий – введения экзосом мезенхимальных стромальных клеток – по сравнению с традиционным ведением послеродового периода.

Оценка содержания диссертации

Диссертационное исследование представлено в виде рукописи, изложено на 191 странице текста компьютерного набора (формат А4) и состоит из введения, шести глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Список литературы представлен 241 источником, из которых 170 в зарубежных изданиях. Визуализация данных представлена 21 таблицей, 59 рисунками и микрофотографиями.

«**Введение**» представлено актуальностью проблемы, сведениями о степени разработанности темы диссертационного исследования, точным отражением цели диссертации, сформулированных задач, научной новизны, теоретической и практической значимости, положений, выносимых на защиту. В главе изложены сведения о внедрении результатов исследования в практику, связи работы с научными программами, соответствии диссертации паспорту научной специальности. Представлены данные об апробации работы. Отражена структура и объём

диссертации, публикации. Отмечен личный вклад автора в диссертационное исследование.

Автор в этой главе приводит мировые данные о проблемах оперированной матки, росте частоты повторного кесарева сечения и рисках разрыва стенки матки в родах. Переданы сомнения и предложения исследователей различных стран по вопросам ведения первого периода родов с рубцом на матке, отражены аргументы по обоснованию применения методов визуализации толщины миометрия в области нижнего сегмента и способов купирования болевого синдрома. Возникает вопрос о необходимости выявления возможных этиологических факторов, приводящих к формированию несостоятельного рубца на матке, что поможет сформировать стратегию профилактики данного грозного осложнения и снизить частоту повторного абдоминального родоразрешения.

Особое внимание во введении отведено обоснованию успешного применения мезенхимальных стромальных клеток в акушерстве и гинекологии на протяжении 15 лет. Терапевтический потенциал МСК объясняется способностью к многолинейной дифференцировке и самообновлению. Представлены результаты исследований, демонстрирующих иммуномодулирующие, противовоспалительные, ангиогенные, антиапоптотические и трофические свойства МСК. Представлены данные о преимуществах МСК, полученных из пуповины (МСКП), по сравнению с МСК из костного мозга, жировой ткани и менструальной крови, так как они обладают сильным иммуносупрессивным действием, низкой иммуногенностью, а также способностью к самообновлению и многолинейной дифференцировке. Но самое главное, в главе приводятся данные иностранных исследователей, объясняющих терапевтический эффект МСК секрецией таких внеклеточных носителей как экзосомы, практически лишенных иммуногенности.

Глава 2 отражает материалы и методы, дизайн из 4 этапов исследования с подробной характеристикой экспериментального и клинического фрагмента. Четко обозначены критерии включения и исключения из исследования. Подробно описаны методы получения культуры мезенхимальных стромальных клеток из кондиционной среды и экстрацеллюлярных микровезикул мезенхимальных стромальных клеток. Морфометрическое изучение структурной организации матки проводили в соответствии с рекомендациями литературы. Подробно

охарактеризованы методы статистической обработки данных. Дана полная характеристика инструментальных методов обследования пациенток (МРТ, УЗИ, гистероскопия).

В главе 3 приводится обоснование применения экзосом мезенхимальных стромальных клеток в эксперименте. В соответствии с I этапом дизайна исследования была создана и апробирована модель кесарева сечения у 342 лабораторных животных: 153 с введением экзосом МСК и 189 без экзосомной поддержки. Смоделированное кесарево сечение с последующим введением экзосом ЭМСК в область швов на матке выполнялось в условиях операционной с соблюдением правил асептики и антисептики. Определение экзосом в исследуемых тканях проводилось на 2 и 8 сутки с помощью люминесценции на фоне применения фильтра Rhod в виде очень мелких пылевидных объектов с ярко-красным свечением.

Показано, что при введении ЭМСК в интактные ткани матки крысы а 2-е и 8-е сутки количество мелких пылевидных объектов, светящихся красным цветом, было значительно меньше, чем на 2-е и 8-е сутки после инъекции ЭМСК в область швов на матке. Значимо, что постепенно количество экзосом в тканях матки уменьшается, что, по мнению автора, происходит вследствие фагоцитоза макрофагами и, возможно, миграции экзосом в сосудистое русло.

Эффективность применения ЭМСК доказана посредством отсутствия летальности и меньшим числом мертворождений в группе прооперированных животных с экзосомной поддержкой по сравнению с группой контроля.

Глава 4 характеризует клинический этап исследования с ретро- и проспективным анализом течения беременностей, родов и послеродового периода, а именно продолжительность послеоперационного койко-дня, расширение нижней трети полости матки по данным УЗИ, показателей воспалительной реакции (лейкоцитоза и С-реактивного белка), весо-ростовые показатели новорожденных и оценка по Апгар, отсутствию инфекционно-воспалительных осложнений и формировании полноценного рубца у пациенток с рубцом на матке после введения ЭМСК (60 женщин) и без применения клеточных технологий (700 женщин). Для объективизации состояния послеоперационного рубца на матке

части пациенток были проведены МРТ, УЗИ органов малого таза и офисная гистероскопия через 6–12 месяцев после предшествующего кесарева сечения. У женщин, которым в ходе кесарева сечения проводилась экзосомная поддержка, достоверно продемонстрированы меньшая продолжительность послеоперационного койко-дня, отсутствие расширения нижней трети полости матки и показателей воспалительной реакции и инфекционно-воспалительных осложнений, и, главное, предоставлены данные, подтверждающие формирование полноценного рубца через 6-12 месяцев по данным МРТ, УЗИ и гистероскопии.

Глава 5 состоит из двух разделов. Первый посвящен анализу родоразрешения пациенток с рубцом на матке после кесарева сечения на фоне введения им ЭМСК и без применения клеточных технологий в анамнезе. У пациенток, с введенными в ходе первого кесарева сечения экзосомами МСК, частота самопроизвольного родоразрешения достигла 15/21 (71,4%), что в 8,16 раза больше по сравнению с женщинами из группы ретроспективного анализа – 21/240 (8,75%) и в 3,6 раза больше по сравнению с беременными и роженицами группы сравнения – 4/20 (20%). Кроме того, автором показано отсутствие гнойно-септических осложнений и достоверное увеличение толщины рубца по данным МРТ и УЗИ, а также по данным клинических и морфологических исследований.

Второй раздел посвящен анализу результатов морфологического исследования миометрия в области и рубца и границы между рубцом и миометрием: у пациенток с предшествующей экзосомной поддержкой и у пациенток из группы сравнения без применения клеточных технологий. У пациенток, которым в ходе предыдущего кесарева сечения не вводились экзосомы МСК, была отмечена меньшая эластичность и большая травматизация рубца во время беременности и родов на фоне увеличения численной плотности нейтрофилов, тучных и дегенерирующих клеток.

Глава 6 «Обсуждение полученных результатов» является вариантом дискуссии между автором и другими учеными при анализе и обобщении собственных и общемировых данных. Стиль изложения, аргументированность умозаключений, представленные способы улучшения репарации миометрия, данные

отечественной и мировой статистики позволяют осознать колоссальную сложность выбранной для исследования темы, поскольку наличие рубца на матке представляет сегодня не только медицинскую, но и серьезную социально-демографическую проблему.

В последующем **Заключении** Евгения Олеговна суммирует основные положения диссертации, обосновывает необходимость применения ЭМСК в акушерской практике после абдоминального родоразрешения с целью снижения частоты гнойно-септических осложнений в послеродовом периоде, а также с целью повышения возможности самопроизвольного родоразрешения пациенток с рубцом на матке.

Основные результаты исследования сформулированы в **13 выводах**, последовательно и строго отвечающих поставленным задачам, в полной мере соответствующим представленным результатам. Практические рекомендации по применению экзосом мезенхимальных стромальных клеток в плане профилактики инфекционно-воспалительных осложнений при проведении абдоминального родоразрешения вытекают из результатов исследования. Согласно диссертационной работе всем первородящим, планирующим повторную реализацию репродуктивной функции, которым предстоит кесарево сечение, автор рекомендует интраоперационное введение 500 мкл экзосом мезенхимальных стромальных клеток пуповинного происхождения в область шва нижнего маточного сегмента для последующего самопроизвольного родоразрешения.

Замечаний к работе по содержанию и оформлению нет. В порядке дискуссии хотелось бы задать **два вопроса**:

1) Каков, по мнению диссертанта, оптимальный алгоритм оценки состояния рубца на матке вне и во время беременности? Сравнительный анализ состояния рубца до и после введения ЭМСК позволяет делать выводы клиницисту при составлении плана ведения родов?

2) Каково мнение диссертанта по поводу перспектив применения экзосом в акушерской практике?

Заключение. Диссертационная работа Пекаревой Е.О. на тему: «Клинико-экспериментальное обоснование применения клеточных технологий после абдоминального родоразрешения» является завершенной научно-квалификационной

работой, содержащей новое решение актуальной для акушерства и гинекологии научной проблемы, связанной с улучшением репаративных свойств миометрия после операции кесарева сечения с целью повышения частоты самопроизвольных родов с рубцом на матке и снижения гнойно-воспалительных осложнений. Диссертация по своей актуальности, научной новизне, методическому уровню выполнения исследования, теоретической и практической значимости полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 26.05.2020 г. № 751 и от 20.03.2021 г. № 426), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.4. - Акушерство и гинекология.

Заведующий кафедрой акушерства