

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Цхай Виталия Борисовича на диссертационную работу Пекаревой Евгении 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

В настоящее время известно множество способов снижения частоты операций кесарева сечения, однако они не приводят к желаемым результатам, и, как следствие, в РФ наблюдается стойкий рост абдоминального родоразрешения и осложнений, связанных с ним. Поэтому во всем мире продолжается активный поиск методов улучшения репаративных свойств миометрия после перенесенного абдоминального родоразрешения, чтобы обеспечить пациентке в будущем безопасную возможность самопроизвольных родов при наличии рубца на матке. Для решения этой серьезной медицинской и социально-демографической проблемы возлагаются большие надежды на применение и широкое клиническое внедрение клеточных технологий, которые сегодня приобретают особую актуальность. Серьезная дискуссия ведется о перспективах применения мезенхимальных стромальных клеток и продуктах их секрета, таких как экзосомы, основное преимущество которых заключается в отсутствии генетического и клеточного материала. Особый интерес представляет собой не только улучшающие репарацию миометрия механизмы действия экзосом, но и их эффективность в профилактике инфекционно-воспалительных осложнений.

Частота инфекционно-воспалительных осложнений после кесарева сечения в 5 раз выше, чем после самопроизвольных родов. Важно помнить и о том, что гнойно-септические заболевания в акушерской послеродовой клинике

занимают IV место среди причин материнской смертности. Кроме того, после кесарева сечения увеличивается риск тромбозмболических осложнений в 3,8 раза, риск разрыва матки при последующих беременностях – в 42 раза, абдоминальных болей – в 2 раза, травмы мочевого пузыря – в 36 раз, что снова доказывает острую необходимость снижения частоты повторного абдоминального родоразрешения в современном мире, что и является целью настоящего исследования, как и профилактика инфекционно-воспалительных осложнений в послеродовом периоде за счет экспериментального обоснования и клинического применения клеточных технологий. Для достижения поставленной цели было определено 7 задач, последовательное выполнение которых и позволило выполнить данное диссертационное исследование.

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

Обоснованность научных положений, сформулированных в диссертации Пекаревой Евгении Олеговны, обусловлена масштабом экспериментального этапа при создании у 342 лабораторных животных модели рассечения маточных рогов с последующим введением экзосом мезенхимальных стромальных клеток пуповинного происхождения и объемом проведенного ретро- и проспективного исследований на клиническом этапе (790 пациенток, 60 из которых после абдоминального родоразрешения проведено интраоперационное введение экзосом мезенхимальных стромальных клеток пуповинного происхождения), а так же результатами примененных современных эндоскопических, лучевых и сонографических методов исследования.

Основательность диссертационного исследования определил дизайн исследования с четкой методологией выполнения. Реализовать все поставленные задачи и достичь цели диссертационной работы помогли клинико-лабораторный, морфологический, статистический методы исследования, результаты которых в полной мере представлены в диссертации. С помощью рутинных методов исследования, таких как УЗИ, МРТ и гистероскопия автору удалось верифицировать

и представить критерии полноценности рубца миометрия после абдоминального родоразрешения после введения экзосом.

Научные положения, выводы и практические рекомендации диссертационного исследования полностью соответствуют представленным данным. За время выполнения диссертации было опубликовано 27 печатных работ, из них 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). Результаты диссертационного исследования Пекаревой Е.О. обсуждены на Всероссийских и международных конференциях и форумах.

Научная новизна исследования

Научная новизна данного диссертационного исследования не вызывает сомнений. В настоящее время отмечается увеличение частоты как несостоятельных рубцов на матке после КС, так и числа связанных с этим патологическим состоянием осложнений, а автором предложен новый метод улучшения репаративных свойств миометрия после кесарева сечения путем введения 500 мкл ЭМСК. Сначала в эксперименте была создана модель кесарева сечения на фоне многоплодной беременности у мелких экспериментальных животных с интраоперационным введением ЭМСК, оценена длительность их пребывания в исследуемых тканях: как в интактных, так и после хирургического вмешательства, доказана возможность вагинального родоразрешения у крыс с рубцом на матке в условиях применения клеточных технологий. На последующем клиническом этапе проведено интраоперационное введение экзосом мезенхимальных стромальных клеток в область разреза нижнего сегмента для профилактики инфекционно-воспалительных послеродовых осложнений и улучшения репарации тканей с морфологическим подтверждением полноценности тканей миометрия. На фоне применения клеточных технологий частота самопроизвольных родов достигла 71,4 %, в то время как в РФ их доля не превышает 1,5 %.

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

Диссертация изложена на 191 странице машинописного текста и состоит из введения, шести глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Критический анализ 241 источника литературы позволил диссертанту логично обосновать цели и задачи исследования. Семь задач соответствуют выбранной цели исследования: 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. Данная работа иллюстрирована 21 таблицей, 59 рисунками и микрофотографиями.

«**Введение**» представлено актуальностью проблемы, сведениями о степени разработанности темы диссертационного исследования, точным отражением цели диссертации, сформулированных задач, положений, выносимых на защиту. Научная новизна и практическая значимость не вызывают сомнений. В главе изложены сведения о внедрении результатов исследования в практику, связи с научными центрами, соответствии диссертации паспорту научной специальности. Отражена структура и объём диссертации, публикации. Отмечен личный вклад автора в диссертационное исследование. Представлены данные об апробации работы.

Обзор литературы соответствует теме диссертации (глава 1). При чтении обзора литературы можно сделать вывод, что автор хорошо владеет изучаемой научной проблемой оперированной матки в современном акушерстве. В этой главе приводятся сравнительные данные о возможности и об эффективности

применения мезенхимальных стромальных клеток костно-мозгового, мезенхимального происхождения, из жировой ткани и тканей пуповины в эксперименте и в клинической практике. Также приводятся характеристика экзосом и результаты их исследования в доклинической практике при лечении синдрома Ашермана, преждевременного истощения яичников, повышения эффективности ВРТ. Достоинством следует признать информативность данной главы, заканчивающейся кратким резюме, в котором сформулирована важная роль экзосом в опосредованной межклеточной коммуникации и создании благоприятных условий для улучшенного восстановления тканей, в том числе и рубца на матке, и как результат, возможность ведения самопроизвольных родов с рубцом на матке после одного истмического кесарева сечения при нормальной локализации плаценты вне рубца и при отсутствии неравномерного критического истончения зоны рубца с признаками деформации и явлениями болезненности при надавливании влагалищным датчиком после введения экзосом во время предшествующего кесарева сечения.

Глава 2 посвящена характеристике лабораторных животных и экспериментально созданной им модели кесарева сечения, а также ретро- и проспективному анализу обследованных женщин. Продемонстрированы и методы проводимых исследований. Следует отметить, что выбранные методики современны и доступны для всех учреждений третьего уровня (МРТ, УЗИ, гистероскопия). Важным в данной диссертационной работе является иллюстрированное описание методики введения экзосом в интактные ткани и в область швов на матке у лабораторных животных, а также примеры обнаружения экзосом в исследуемых тканях на 2 и 8 сутки с помощью методов световой микроскопии.

Подробно описаны методы получения экзосом мезенхимальных стромальных клеток, а так же результаты морфологического анализа исследуемых тканей после введения экзосом как в эксперименте, так и на клиническом этапе. Подробно охарактеризованы методы статистической обработки данных.

В **главе 3** в соответствии с I этапом дизайна исследования приводятся результаты применения экзосом мезенхимальных стромальных клеток у 342

лабораторных животных. Автором описана и продемонстрирована методика расчленения рогов матки с последующим введением в область швов 50 мкл экзосом. Представлены и последующие успешные результаты родоразрешения лабораторных животных после примененных клеточных технологий.

Отсутствие летальности, меньшее число мертворождений, большее число помета в группе прооперированных животных с экзосомной поддержкой по сравнению с группой контроля – позволили оценить применение данной клеточной технологии как эффективной.

Глава 4 «Результаты собственных клинических исследований» состоит из нескольких разделов. Первый, согласно II этапу дизайна исследования, характеризует течение послеоперационного периода у 600 пациенток после абдоминального родоразрешения. Проанализированы причины проведения кесарева сечения в плановом и экстренном порядке, оценены массо-ростовые показатели и состояние новорожденных по шкале Апгар, представлены такие показатели родоразрешения у беременных и рожениц, как длительность безводного промежутка и самой операции, объем кровопотери, ширина полости матки по данным УЗИ, количество лейкоцитов в общем анализе крови перед выпиской, уровень СРБ, а также длительность пребывания пациенток в стационаре.

Поскольку женщины, которым проводился ретроспективный анализ родоразрешения и течения послеоперационного периода, планировали повторные беременности, то 240 пациенткам было проведено УЗИ и 60 пациенткам МРТ через 6 месяцев после предыдущего кесарева сечения. Автором представлены данные толщины миометрия в проекции рубца на матке с описанием признаков неполноценности согласно данным этих двух обследований. Для объективизации состояния послеоперационного рубца на матке 40 пациенткам, планирующим беременность, была проведена и офисная гистероскопия через 6-12 месяцев после предшествующего кесарева сечения.

Следующий раздел посвящен проспективному анализу течения послеродового периода у 160 пациенток после операции кесарева сечения. Из них 60 первородящим пациенткам, мотивированным на повторные самопроизвольные

роды, интраоперационно в ходе абдоминального родоразрешения проводилось введение 500 мкл экзосом мезенхимальных стромальных клеток пуповинного происхождения. У этих пациенток было зафиксировано более благоприятное течение послеродового периода, по сравнению с пациентками из контрольной группы без экзосомной поддержки. Это проявлялось в уменьшении продолжительности послеоперационного койко-дня, отсутствии расширения полости матки и лабораторных признаков воспаления, а также в формировании полноценного рубца на матке по данным МРТ, УЗИ и гистероскопии.

Глава 5 охватывает обширный клинический материал и посвящена сравнительному анализу родоразрешения 281 пациентки: 240/600 (40%) ретроспективно проанализированных на II этапе женщин с рубцом на матке после кесарева сечения с традиционным ведением послеоперационного периода, 21/60 (35%) женщин, которым в ходе абдоминального родоразрешения вводились экзосомы мезенхимальных стромальных клеток пуповинного происхождения (основная группа) и 20/100 (20%) пациенток без экзосомной поддержки (группа сравнения). Автор описывает сопоставимые у пациенток разных групп осложнения течения беременностей, особенности преиндукции родов при помощи баллона для ускорения созревания шейки матки, очень тщательно описывает ведение I периода родов с динамическим ультразвуковым контролем для оценки полноценности рубца на матке всем пациенткам после абдоминального родоразрешения и 30 пациенткам с интактной маткой для сравнения. Анализ ультразвуковых исследований показал отсутствие значимых различий толщины нижнего сегмента между пациентками, которым применялись клеточные технологии и роженицами из группы контроля практически на протяжении всей активной фазы родов.

Показательны данные об отсутствии различий в длительности I и III периода родов и длительности безводного промежутка во всех подгруппах на фоне увеличения продолжительности II периода родов у пациенток основной группы. Впечатляющим оказался процент самопроизвольных родов у пациенток основной группы - 71,4%, которым в ходе предшествующего абдоминального родоразрешения вводились экзосомы МСК пуповинного происхождения.

Анализ показаний для повторного абдоминального родоразрешения в основной группе выявил отсутствие биологической готовности шейки матки при доношенном сроке беременности, слабость родовой деятельности, не поддающуюся медикаментозной коррекции, и острую внутриутробную гипоксию плода — как самые частые причины.

Особого внимания заслуживают результаты морфологического исследования клинических групп, в ходе которого было изучено строение иссеченного рубца и окружающего его миометрия у пациенток с предшествующей экзосомной поддержкой и у рожениц без использования клеточных технологий. Были оценены особенности гемо- и лимфоциркуляции, распределение соединительной ткани, проведен и цитоморфологический анализ тканевых лейкоцитов в рубце миометрия. У пациенток с примененными клеточными технологиями была отмечена меньшая по сравнению с женщинами без экзосомной поддержки численная плотность нейтрофилов, тучных и дегенерирующих клеток и меньшее количество соединительнотканых волокон на границе рубца и миометрия.

Глава 6 «Обсуждение полученных результатов» написана лаконично, демонстрирует необходимость поиска новых методов улучшения репаративных свойств миометрия после перенесенного абдоминального родоразрешения, чтобы обеспечить пациентке в будущем безопасную возможность самопроизвольных родов в условиях рубца на матке, демонстрирует преимущества течения послеоперационного и послеродового периода у женщин после введения экзосом. Очень четко автор выделяет и необходимость профилактики инфекционно-воспалительных осложнений в послеродовом периоде за счет клинического применения клеточных технологий и дает рекомендации по ведению самопроизвольных родов с рубцом на матке после кесарева сечения.

Объем исследований достаточен. Проведенная компьютерная статистическая обработка материала подтверждает достоверность результатов и делают обоснованными выводы и практические рекомендации, вытекающие из диссертационной работы. Поставленная цель и задачи исследования соответствуют полученным результатам диссертационного исследования.

В Заключении отражены основные положения диссертации и подтверждена 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.

Выводы соответствуют поставленным задачам и представленным результатам диссертационной работы, из которых вытекают практические рекомендации по применению экзосом мезенхимальных стромальных клеток.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

Материалы диссертации нашли отражение в 27 опубликованных работах, в том числе 15 статей в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК Минобрнауки РФ и в изданиях, цитируемых в системе SCOPUS, что является достаточным для отражения основных результатов диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук.

Замечаний к работе по содержанию и оформлению нет.

Вопросы к диссертанту:

1. Почему, согласно практическим рекомендациям, применение клеточных технологий эффективно и безопасно при выполнении операции кесарева сечения только у первородящих, планирующих повторную реализацию репродуктивной функции?
2. Какие Вы видите перспективы использования мезенхимальных стромальных клеток и продуктов их секретора – экстрацеллюлярных микровезикул и экзосом в акушерско-гинекологической практике, кроме как при операции кесарева сечения?

Заключение

Диссертационная работа Пекаревой Е.О. на тему: «Клинико-экспериментальное обоснование применения клеточных технологий после абдоминального родоразрешения» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена большая научная проблема акушерства и гинекологии: снижения гнойно-септических

осложнений в послеродовом периоде как одной из причин материнской смертности, а также повышение частоты самопроизвольных родов с рубцом на матке после абдоминального родоразрешения, что имеет важное значение для практического здравоохранения.

Диссертация 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 перинатальной акушерства и гинекологии лечебного Федерального государственного бюджетного образовательного высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор медицинских наук, профессор (специальность: 3.1.4. Акушерство и гинекология)

Подпись д.м.н., проф. В.Б. Духовникова
Ученый секретарь ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор

660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1
Телефон: +7(391) 220-13-95; факс: +7(391) 220-13-96