

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора, члена-корреспондента РАН Парфеновой Е.В. на диссертацию Козырева И.А. на тему: «Результаты ранней радикальной коррекции тетрады Фалло», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Диссертационная работа Козырева И.А. посвящена анализу результатов радикальной коррекции тетрады Фалло у пациентов различного возраста и характеристике функционального состояния мезенхимных клеток сердца у этих пациентов, в частности, системы NOTCH сигналинга, с нарушениями в функционировании которой связано развитие многих врожденных пороков сердца.

Актуальность темы исследования

Тетрада Фалло (ТФ) - самый распространённый цианотический многокомпонентный врожденный порок сердца (ВПС), история хирургического лечения которого насчитывает уже более 70 лет. Несмотря на прогресс в хирургической тактике и методах лечения ТФ остается ряд нерешенных задач. Так сохранение клапана легочной артерии при выполнении радикальной коррекции данного порока является важным фактором, определяющим клиническое состояние больного и функцию сердца в долгосрочном периоде. Поэтому выбор условий и хирургической тактики, позволяющей сохранить клапан легочной артерии, является актуальной задачей в кардиохирургии ВПС. Данная работа направлена на решение задачи выбора оптимальных условий для радикальной коррекции ТФ. Одним из таких условий может быть проведение коррекции в раннем возрасте, однако требуются доказательства того, что она не приведет к утяжелению течения послеоперационного периода.

Другим важным аспектом, определяющим актуальность данного исследования, является значительный прогресс, достигнутый в последние годы в области понимания механизмов регенеративных процессов и участия в

них стволовых и прогениторных клеток, а также в попытках применения клеточных подходов для лечения заболеваний сердца, и, в частности, врожденных пороков, где клеточные технологии могут быть использованы как дополнение к хирургическим методам. В этом аспекте изучение свойств резидентных прогениторных клеток сердца, которые могут быть получены во время хирургических вмешательств от больных с ВПС, представляется особенно актуальным. Помимо этого в работе проведено исследование состояния Notch-сигнального пути в мезенхимных клетках, полученных из ткани сердца больных с ТФ, и играющего важную роль в кардиогенезе, ангиогенезе и регуляции различных клеточных функций, в частности, пролиферации и дифференцировки.

Новизна исследования и полученных результатов

Новые данные, полученные автором, подтвердили обоснованность ранней (до достижения 6 месяцев) радикальной коррекции тетрады Фалло. Установлено, что для увеличения доли клапан-сохраняющих операций при ранней радикальной коррекции тетрады Фалло необходимо использование методов дилатации фиброзного кольца клапана легочной артерии. Показано, что неинвазивные методы обследования не дают истинного представления о размерах легочных артерий и обоснована необходимость их интраоперационной оценки, позволяющей более точно определить показания к выполнению первичной радикальной коррекции.

Установлена связь между активностью сигнального пути Notch в мезенхимных клетках сердца, полученных из ткани желудочков сердца от пациентов с тетрадой Фалло, с уровнем пролиферативной активности этих клеток.

Содержание работы, ее завершенность и оформление

Диссертация построена по традиционной схеме, насчитывает 122 страницы машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы, включающего 180 источников (25 отечественных и 155 иностранных), иллюстрирована 6 таблицами и 33 рисунками.

Во введении автор раскрывает актуальность темы исследования, логично подводит к цели исследования, которая заключается в анализе результатов радикальной коррекции тетрады Фалло, выполненной в различном возрасте, и исследовании функционального состояния мезенхимных клеток сердца, полученных от этих пациентов, формулирует задачи работы, направленные на достижение ее цели, представляет научную новизну, теоретическую и практическую значимость исследования, кратко характеризует методологию и методы исследования, останавливается на положениях, выносимых на защиту, обосновании степени достоверности результатов, апробации работы, личном участии автора в получении результатов, внедрении результатов исследования в клиническую работу. В целом введение оптимального объема, занимает 8 страниц текста, что позволяет автору дать в начале диссертации всю необходимую информацию о работе.

В главе 1 «Обзор литературы» в свете современных представлений рассмотрена Тетрада Фалло, ее клиническая картина, особенности гемодинамики и диагностика, методы хирургической коррекции тетрады Фалло представлены в историческом аспекте, в их развитии и совершенствовании. Автор достаточно подробно останавливается на ранней радикальной коррекции тетрады Фалло, подходах, позволяющих предотвратить использование венстрикулотомии, современных клапан-сохраняющих процедурах, особенностях тактики лечения симптоматических пациентов, условиях, позволяющих расширить показания для ранней радикальной коррекции. Отдельную часть литературного обзора составляет описание роли Notch сигнального пути, как одного из этиологических факторов развития тетрады Фалло, роли мутаций в генах, кодирующих компоненты Notch сигналинга, с которыми может быть связано развитие этого ВПС. Завершается обзор анализом современных представлений о регуляции регенеративных процессов в сердце, роли резидентных мезенхимных клеток и современных подходов к клеточной терапии ВПС.

Обзор демонстрирует высокую научную эрудицию автора и погруженность в исследуемую проблему. Раздел написан с использованием достаточного количества литературных источников. Из обзора с очевидностью вытекает актуальность цели и задач исследования.

В главе 2 представлены материалы и методы исследования, общая организация работы, раскрывающая ее комплексный характер. Для каждого раздела работы (клинического и экспериментального) представлены методологические подходы, четко определены объекты исследования, для пациентов - критерии включения и невключения, приводятся методы статистического анализа. Глава хорошо иллюстрирована рисунками с клиническими примерами ЭХОКГ и компьютерной томографии. Дается подробная характеристика пациентов и культуры изучаемых мезенхимных клеток. В описании методических подходов экспериментальной части приведена характеристика культуры изучаемых мезенхимных клеток, даны все структуры праймеров для ПЦР, подробно описаны используемые методы выделения РНК, обратной транскрипции, ПЦР анализа. Все методические подходы, используемые диагностические и лабораторные методы адекватны цели и задачам работы.

В главе 3 представлены результаты собственных исследований в клинической и экспериментальной части работы. Приводятся результаты анализа интраоперационных данных у 63 пациентов, разделенных на группы в зависимости от возраста, позволившего установить различия между показателями оценки легочных артерий, полученными методами КТ и ЭХОКГ и операционными данными. Полученные автором гемодинамические данные подчеркивают ценность проведения интраоперационной оценки легочных артерий, позволяя сделать вывод о необходимости интраоперационной оценки при выборе радикальной коррекции порока в качестве первичного оперативного вмешательства. Подробный анализ течения послеоперационного периода по таким показателям как инотропный индекс через 24 и 72 часа после коррекции, общая длительность потребности применения инотропных препаратов, медиана времени ИВЛ, длительность госпитализации, а также ряда других интра- и послеоперационных параметров с использованием широкого набора соответствующих статистических методов позволили установить, что у пациентов более раннего возраста интраоперационные, ранние и поздние послеоперационные данные сопоставимы со старшими пациентами, а следовательно более ранние сроки выполнения операции не утяжеляет общее течение интра- и послеоперационного периодов: не увеличивается длительность операции, реанимационного и госпитального периодов, не повышает риск летальности.

Далее автором дается подробный анализ позднего послеоперационного периода и приводятся клинические примеры, хорошо иллюстрированные фотографиями различных этапов операций.

В экспериментальной части приводятся результаты сравнения экспрессии рецепторов и лигандов Notch-сигнального пути в мезенхимных клетках сердца от пациентов с ТФ и ДМЖП. Эти клетки представляют собой удобный и относительно доступный источник клеток сердца человека для изучения процессов, связанных с его развитием и репарацией. Активность Notch-сигнального пути анализировалась по уровню мРНК ключевых генов: NOTCH1-4 и Notch-лигандов JAG1, DLL4, Notch-генов-мишеней HES1, HEY1. Полученные данные выявили нарушения в Notch сигналинге в МКС у пациентов с ТФ в сравнении с пациентами с ДМЖП – ВПС, в развитие которого не вовлечены изменения со стороны Notch-сигнального пути. Полученные данные подтверждают, что нарушение в системе передачи сигналов Notch может быть одним из ключевых факторов, ответственных за нарушения в развитии сердца при ТФ. В то же время автор не обнаружил ассоциаций высокой или низкой активности Notch ни с какими клиническими показателями, в т.ч. с возрастом пациентов, что может свидетельствовать об отсутствии прямого вовлечения изменений активности этого пути в МКС в регуляцию функции сердца и других параметров, определяющих клиническое течение. Учитывая, что пролиферативная активность клеток является важным показателем их регенеративных/репаративных свойств автор исследовал связь уровня пролиферативной активности МКС с возрастом и клиническими параметрами и также не обнаружил каких-либо зависимостей. В то же время была обнаружена связь между активностью Notch сигнального пути (экспрессией эффекторных генов) и активностью пролиферации МКС, демонстрирующая важность уровня активности Notch в поддержании высокой пролиферативной активности МКС. Это обосновывает рациональность воздействия на эту активность, например с помощью вирусной экспрессии NICD, с целью увеличения регенеративных свойств прогениторных клеток.

Глава 4 «Обсуждение» содержит подробный анализ и интерпретацию полученных результатов в сопоставлении с литературными данными, формулирует основные положения диссертации.

Выводы полностью соответствующим задачам исследования и целиком

вытекают из полученных результатов и их анализа.

Практические рекомендации вытекают из анализа полученных результатов и выводов.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертационного исследования. Диссертация и автореферат изложены хорошим литературным языком, хорошо иллюстрированы рисунками и диаграммами.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенный анализ хирургического лечения пациентов с тетрадой Фалло показал, что выполнение радикальной коррекции в возрасте до 6 месяцев сочетается с низким риском осложнений и летальности, что обосновывает рациональность ранней радикальной коррекции тетрады Фалло. Обоснована необходимость интраоперационной оценки размеров ветвей легочной артерии, которая дает более точное представление об их размерах и позволяет расширить показания к выполнению радикальной коррекции, если по данным неизвазивных методов диагностировано наличия гипоплазии центрального легочного русла при одновременном отсутствии дополнительных источников легочного кровоснабжения. Установлено, что при ранней радикальной коррекции тетрады Фалло использование современных клапан-сохраняющих методов в сочетании с различными вариантами пластики створок позволяет сохранить собственный клапан легочной артерии более, чем в 60% случаев.

Установленная прямая связь между активностью сигнальной системы NOTCH и пролиферацией мезенхимных клеток сердца указывает на перспективность активации этой системы с целью повышения регенеративных свойств этих клеток.

Подтверждение публикаций по теме диссертации

По теме диссертационного исследования опубликовано 5 научных статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией Минобразования России, и одна статья в журнале *Pediatr Res.*, импакт фактор 2,88, SJR 1.34, входящем в первый квартиль (Q1) по уровню цитируемости. В пяти статьях, включая статью в *Pediatr Res.*, диссертант является первым автором.

Результаты были многократно представлены на научных форумах различного уровня, в том числе, и международных.

Замечания и вопросы

Принципиальных замечаний нет. В ходе изучения диссертации возникли вопросы к автору и замечания непринципиального характера, которые не умаляют положительной оценки диссертационной работы И.А. Козырева в целом.

1. В работе используется термин мезенхимные клетки сердца. В то же время хорошо известно, что во многих тканях присутствуют мезенхимные стволовые клетки, располагающиеся в сосудистом компартменте, которые в культуре получили название мультипотентные мезенхимные стромальные клетки. Они хорошо охарактеризованы по дифференцировочным свойствам, экспрессии поверхностных маркеров, регенеративному потенциалу. Выделенные из разных тканей (костного мозга, жировой, плаценты или ткани пуповины) они всегда называются МСК и имеют значительную часть общих свойств. Клетки, которые Вы изучали, могут быть отнесены к МСК, или это какая-то иная популяция клеток? Если «да», то по каким характеристикам они могут быть отнесены к классическим МСК?

2. В диссертации отождествляются стволовые клетки сердца и клетки-предшественники кардиомиоцитов, что неправильно (стр. 36). Стволовая клетки и клетка-предшественник – это не одно и то же.

Заключение

Диссертационная работа Козырева Ивана Александровича на тему: «Результаты ранней радикальной коррекции тетрады Фалло», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология является завершенной научно-квалификационной работой выполненной на высоком методическом уровне, в

которой содержится решение актуальной для современной клеточной биологии задачи – изучение мезенхимных клеток сердца и активности Notch сигнального пути в этих клетках, и задачи для сердечно-сосудистой хирургии – оценка результатов выполнения ранней радикальной коррекции тетрады Фалло. Учитывая актуальность, практическую значимость полученных результатов и вытекающих из них научных положений, выводов и рекомендаций, диссертационная работа Козырева И.А. на тему: «Результаты ранней радикальной коррекции тетрады Фалло» соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации «О порядке присуждения учёных степеней» от 24.09.2013 г. № 842, в части требований, предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент

директор НИИ экспериментальной кардиологии
ФГБУ "Национальный медицинский
исследовательский центр кардиологии "
Минздрава России
доктор медицинских наук, профессор,
член-корр. РАН



Елена Викторовна Парфенова

ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии "
Минздрава России, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а, тел. 8 (495)
414-67-12; e-mail: yeparfyon@mail.ru

Подпись доктора медицинских наук, профессора Парфеновой Е.В.
удостоверяю:

Учёный секретарь ФГБУ "НМИЦ Кардиологии" Минздрава России,
доктор медицинских наук

Скворцов Андрей Александрович

16 марта 2020 г.

