

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

Государственного бюджетного
учреждения «Санкт-Петербургский
научно-исследовательский институт
скорой помощи им. И.И. Джанелидзе»
доктор медицинских наук, профессор



В.Е. Парфёнов

2016 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе» о научно-практической значимости диссертации Насрединова Артёма Сергеевича на тему: «Тканевая инженерия кровеносных сосудов малого калибра на основе децеллюляризованной артерии пуповины человека», представленной к официальной защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия и 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология (медицинские науки)

Актуальность темы выполненной работы

Актуальность темы диссертационного исследования Насрединова А.С. определяется высокой социальной значимостью сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца, цереброваскулярная болезнь, хроническая ишемия нижних конечностей. Несмотря на

постоянное совершенствование терапевтических способов лечения, методы прямой реваскуляризации остаются золотым стандартом в лечении этих заболеваний. Наиболее оптимальным материалом для замещения функции пораженных артерий являются аутологичные сосуды. С этой целью чаще всего используется большая подкожная вена и, реже, аутоартерии, являющиеся эталоном при разработке искусственных заменителей сосудов. Синтетические протезы обеспечивают хорошую проходимость при размере более 6 мм, при меньшем размере результаты остаются неудовлетворительными из-за их высокой тромбогенности. В этой связи потребность в новом виде сосудистых протезов со свойствами нативной артерии очень высока.

Принципиально новым подходом является тканевая инженерия, которая может удовлетворить потребность в материале для шунтирующих операций. Используя методы тканевой инженерии, биопротезы могут быть сконструированы из клеток пациента, представляя собой живую ткань с высокой биосовместимостью и способностью к росту, восстановлению и ремоделированию. При этом размер, длина и количество тканеинженерных конструкторов не ограничены. Тканевая инженерия является довольно новым направлением в науке, достигнув за последние 10-15 лет многообещающих результатов. Диссертационная работа Насрединова Артёма Сергеевича, выполненная в федеральном государственном бюджетном учреждении «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России) и представленная на рецензию, восполняет недостаток отечественных наработок в этой области и является, несомненно, актуальной.

Связь диссертационного исследования с планами научно-исследовательских работ

Диссертация выполнена в рамках государственного задания ФГБУ СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, прикладные научные исследования, тема № 6 «Создание клапанных и сосудистых криоконсервированных гомографтов с элементами тканевой

модификации»; сроки выполнения 2012-2014 гг. Тема диссертации была утверждена на заседании Ученого совета ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» МЗ РФ 30.03.2012, протокол № 3.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Впервые доказана возможность эффективной децеллюляризации артерий пуповины человека. Разработана новая методика децеллюляризации артерий пуповины. Создан оригинальный биореактор для успешного посева МСК на матрицу децеллюляризованной артерии пуповины. Получен сосуд, высокая проходимость которого подтверждена в эксперименте. Впервые изучено изменение клеточного состава сосудистой стенки *in vivo*.

Достоверность результатов данной работы подтверждена достаточным объемом исследований при разработке метода децеллюляризации и рецеллюляризации, комплексном анализе механических свойств внеклеточных матриц сосудов, адекватным использованием современных методов гисто-морфологического анализа, а также изучением проходимости полученного сосуда в эксперименте. Адекватным является и выбор статистических методов обработки данных. Полученные результаты полностью отражены в основных положениях, выносимых на защиту, выводах и практических рекомендациях. Результаты исследования дополнены достаточным количеством наглядных и убедительных иллюстраций, подтверждающих справедливость сделанных в работе выводов.

Научно-практическая значимость полученных результатов

Научная и практическая значимость диссертации для улучшения результатов сердечно-сосудистых реконструктивных операций вполне очевидна. Автором показана возможность создания кровеносных сосудов с заданными характеристиками с помощью методов тканевой инженерии.

Проведен большой комплекс гистологических исследований. Разработана оригинальная методика децеллюляризации артерий пуповины человека. Оптимизирован способ доставки клеток на матрицу с помощью комбинации статического метода и последующей перфузии графта в проточном биореакторе собственной конструкции. Оценена проходимость тканеинженерных графтов в эксперименте *in vivo*. Применение описанных биопротезов малого калибра в клинической практике может сократить время операции, необходимое для забора шунта, исключить связанный с этим риск осложнений, а также незаменимо при отсутствии подходящих аутососудов, например, при повторных операциях.

Содержание работы, её завершенность и оформление

Материал диссертационной работы изложен на 114 страницах, иллюстрирован 44 рисунками и 3 таблицами. В список литературы включено 184 источника, из которых 13 отечественных и 171 зарубежных авторов.

Во введении обоснована актуальность проблемы, четко сформулированы цель, задачи исследований и основные положения, выносимые на защиту, а также указана научная новизна, практическая ценность полученных результатов. Целью диссертационной работы является разработка способа создания биопротеза кровеносного сосуда малого калибра со свойствами нативной артерии. Задачи исследования соответствуют цели.

В первой главе представлен обзор литературы, в котором автор, опираясь в основном на зарубежные публикации, достаточно широко отразил современные тенденции тканевой инженерии кровеносных сосудов, систематизировал способы заселения клеток на носитель, отметил нерешенные проблемы, такие как выбор клеток для засева (стволовые или дифференцированные клетки сосудистой стенки), материал носителя и т.д.

Одним из способов конструирования искусственного сосуда является посев клеток пациента на трехмерный биodeградируемый матрикс. В своей работе автор выбрал в качестве такой основы артерию пуповины человека, обладающую необходимыми физическими

характеристиками, такими как диаметр, длина, механическая прочность и эластичность. Для удаления чужеродных клеток из стенки артерии разработана собственная методика, приоритет которой подтвержден патентом РФ на изобретение N2504334. Изучению механических характеристик обработанной артерии пуповины, которые определяют прочность будущей тканеинженерной конструкции, посвящен отдельный этап работы. В результате автором был сделан вывод, что механические свойства артерий пуповины сохраняются после децеллюляризации, в том числе после длительного хранения.

Использование мезенхимных стволовых клеток крысы соответствует выбранной экспериментальной модели и общей тенденции в данной области. Автором проведена большая работа по оптимизации и повышению эффективности засева клеток на внеклеточный матрикс артерий пуповины. Результаты рецеллюляризации удалось улучшить, используя сочетание статического метода доставки клеток с последующей перфузией сосудистого кондуита в оригинальном биореакторе. Время прекультивирования от посева клеток до имплантации тканеинженерного сосуда лабораторному животному составило 5 суток.

Эксперименты *in vivo* проведены на крысах породы Вистар. Сформировано 3 группы исследования: 5 животным имплантировали аорту другой крысы, 10 - децеллюляризованную артерию пуповины, незасеянную клетками и еще 10 имплантировали тканеинженерный кровеносный сосуд. Срок наблюдения составил 30 суток. В результате все 5 имплантатов первой (контрольной) группы оказались проходимы; тканеинженерные сосуды, предварительно засеянные мезенхимными стволовыми клетками, показали значительно более высокий уровень проходимости (89%) по сравнению с незасеянными сосудистыми кондуитами (22%). Гистологически структура засеянных графтов через месяц после имплантации изменилась и напоминала строение нативной артерии.

Подробному обсуждению полученных результатов посвящена четвертая глава диссертации. Отмечена необходимость дальнейших исследований в выбранном направлении, которое, несомненно, является перспективным.

В заключении автор кратко приводит результаты проделанной работы и отмечает, что описанный способ создания тканеинженерных сосудов может быть пригоден не только для решения экспериментальных задач, но и, возможно, для реконструктивной сердечно-сосудистой хирургии.

Логичным завершением диссертации являются выводы и практические рекомендации, которые четко сформулированы и обоснованы полученными результатами исследования.

По материалам диссертации опубликованы 11 печатных работ, из них 5 статей в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций.

Автореферат полностью отражает текст диссертации и оформлен в соответствии с требованиями ВАК РФ.

Замечания к работе

Диссертация написана хорошим научным языком, читается легко и имеет четкую структурную и логическую последовательность в изложении материала. Принципиальных замечаний нет, однако в порядке дискуссии хотелось бы обсудить вопросы:

1. Какие преимущества дает использование мезенхимных стволовых клеток и возможно ли использовать другие источники клеток для создания тканеинженерных сосудов по описанной методике?

2. Почему при проведении экспериментальной части работы был выбран срок наблюдения 30 суток?

3. Очевидно, что мезенхимные стволовые клетки, предварительно засеянные на матрикс до операции, играли ключевую роль в обеспечении проходимости графтов. Интересно при этом, что в образцах, эксплантированных через 30 суток после операции, этих клеток обнаружить уже не удалось. Интересно услышать мнение автора по этому поводу.

Рекомендации по использованию результатов и выводов исследования

Для улучшения результатов операций коронарного шунтирования, бедренно-тибиального шунтирования необходимо создание искусственного протеза малого калибра со свойствами нативной артерии. Обеспечение только механических свойств недостаточно (например, протез из политетрафторэтилена). Необходимо наличие живых клеток на внутренней поверхности графта, способных обеспечивать атромбогенность, рост и регенерацию биопротеза. Результаты диссертационного исследования показывают возможность получения заменителя кровеносного сосуда нового поколения, отвечающего этим требованиям. Описанная тканеинженерная конструкция может быть использована в продолжение экспериментальной работы в ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России и других лабораториях. Можно и необходимо исследовать возможность использования изготовленного сосуда в клинической практике.

Заключение

Диссертация Насрединова Артёма Сергеевича «Тканевая инженерия кровеносных сосудов малого калибра на основе децеллюляризованной артерии пуповины человека» по специальностям 14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия и 03.03.04 – клеточная биология, цитология и гистология (медицинские науки) полностью соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, и может быть представлена к публичной защите в диссертационном совете. Является научной квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи – создание кровеносных сосудов малого калибра методами тканевой инженерии.

Соискатель заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия и 03.03.04 – клеточная биология, цитология и гистология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Ученого совета государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе» (протокол № 6 от 30 июня 2016 г.).

Руководитель отдела неотложной
сердечно-сосудистой хирургии
государственного бюджетного учреждения
«Санкт-Петербургский
научно-исследовательский институт
скорой помощи им. И.И. Джанелидзе»
доктор медицинских наук, профессор
" 30 " июня 2016 г.

В.В. Сорока



Подпись Сороки Владимира Васильевича заверяю:
Ученый секретарь Ученого Совета
государственного бюджетного учреждения
«Санкт-Петербургский
научно-исследовательский институт
скорой помощи им. И.И. Джанелидзе»
доктор медицинских наук, профессор
" 30 " июня 2016 г.

В.Ф.Озеров



Адрес: 192242, Санкт-Петербург, Будапештская ул., дом 3, лит.А

Телефон: (812) 774-86-75 e-mail: info@emergency.spb.ru