

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора, Силиной Екатерины Владимировны на диссертационную работу Абрамяна Шмавона Маисовича «Механизмы гибели клеток при ишемии/реперфузии тканей при пластических операциях по коррекции контуров лица» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология.

Актуальность темы

Изучение феномена ишемии/реперфузии является важной задачей патофизиологии. Это связано с тем, что восстановление кровообращения после периода ишемии вызывает ухудшение состояния пациента, которое носит системный характер и затрагивает различные органы и ткани. Механизмы данного феномена являются предметом изучения патофизиологов. Показано, что при этом развивается системная воспалительная реакция, возрастает количество цитотоксических Т-лимфоцитов, натуральных киллеров, нейтрофилов, интерлейкина-1; происходит активация перекисного окисления липидов, нарушается антиоксидантная защита; снижается регенеративный потенциал тканей. При ишемии/реперфузии наблюдаются нарушение функций митохондрий, стресс эндоплазматического ретикулума, которые приводят клетки к апоптозу.

Показано, что защитную роль при этом играет аутофагия, которая позволяет поддерживать жизнеспособность клеток в условиях данного состояния. Для того, чтобы предотвратить негативное влияние реперфузии после ишемии были апробированы различные технологии, в частности, введение стволовых клеток, антиоксидантов, ингибиторов провоспалительных цитокинов, гормонов, применение гипербарической оксигенации и др. Однако, оптимального подхода для предотвращения гибели клеток после ишемии/реперфузии до сих пор не найдено.

При проведении хирургических операций по коррекции контура лица гибель клеток после ишемии/реперфузии негативным образом отражается на операционном шве и коже лица. Такие операции могут приводить к послеоперационным осложнениям, в том числе к некрозу мягких тканей в области шва. Причем небольшие зоны некроза регистрируются почти всегда, что способствует образованию послеоперационных рубцов. В кожных лоскутах при ишемии/реперфузии обычно имеется воспалительный процесс, повышена гибель клеток за счет апоптоза и некроза.

В то же время в литературе практически отсутствуют работы, в которых содержатся данные по изучению механизмов гибели клеток кожи и подкожной клетчатки при таких операциях. Понимание таких механизмов предоставит возможность отработать оптимальные пути защиты этих клеток от последствий реперфузии при операциях по коррекции контуров лица, что делает работу Ш.М. Абрамяна актуальной как в фундаментальном, так и прикладном аспектах.

Научная новизна и практическая значимость исследований

В диссертационном исследовании Абрамяна Ш.М. представлены научные результаты, обладающие научной новизной и имеющие практическую значимость.

Так, автор впервые применил собственную усовершенствованную методику получения первичной культуры жизнеспособных клеток из операционного материала, которая позволяет изучать тонкие механизмы регуляции сигналов гибели клеток и возможность восстановления их жизнеспособности после ишемии.

Абрамяном Ш.М. было впервые показано, что при ишемии/реперфузии в клетках кожи и подкожно-жировой клетчатки при операциях по коррекции контуров лица активированы различные механизмы гибели клеток, а именно апоптоз и некроптоз. При этом было проведено измерение как спонтанного, так и индуцированного апоптоза. Уровни спонтанного и церамид-

индуцированного апоптоза повышены при ишемии/реперфузии по сравнению с контролем, что особенно выражено после 50 лет. Активированы также процессы аутофагии, которые имеют протективный характер и защищают клетки от гибели.

Впервые доказано, что наличие загара, полученного непосредственно перед операцией лифтинга, потенцирует сигнальные пути гибели клеток кожи и подкожно-жировой ткани, и это негативно сказывается на течении послеоперационного периода.

Впервые автору удалось показать эффективность применения цитопротекторов в предоперационном периоде лифтинга лица – улучшение энергетического статуса клеток в пределах операционного поля и более гладкое течение послеоперационного периода (длительность заживания, частоту осложнений, состояние рубца).

Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Абрамяна Ш.М. выполнена с применением широкого спектра исследований, включая биохимические, цитологические, клинические. Результаты исследования получены на современном сертифицированном оборудовании, что свидетельствует об их достоверности. Количество использованных образцов биологического материала достаточно для получения достоверных результатов. Методы исследования адекватны поставленным задачам, работа выполнена на высоком методическом уровне.

Автором удачно разработан дизайн исследования, который обеспечивает объективность полученных результатов. Полученные данные были подвергнуты адекватной статистической обработке. Положения, выносимые на защиту, рекомендации и выводы корректно сформулированы, обоснованы и базируются на достоверных данных, имеют большую фундаментальную и практическую значимость.

При выполнении данной работы провели сравнительную оценку состояния клеток кожи и подкожно-жировой клетчатки, выделенных в самом начале операции и после её окончания, когда они находились в состоянии ишемии/реперфузии. Была проанализирована экспрессия целого ряда сигнальных белков, ответственных за активацию аутофагии, апоптоза и некроптоза. С этой целью использовались моноклональные антитела, меченные флуоресцентными красителями, и проводился анализ на проточном цитометре.

Достоверность и обоснованность положений, выносимых на защиту, а также выводов, определяются большим фактическим материалом, высоким методическим уровнем проведённого исследования, адекватной статистической обработкой полученного материала. Все поставленные задачи успешно решены, выводы полностью соответствуют полученным результатам исследования.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Высокий научно-методический уровень работы Абрамяна Ш.М. и высокая актуальность проведенного исследования позволили получить значимые как в фундаментальном, так и в практическом аспектах результаты.

Абрамяном Ш.М. предложена усовершенствованная методика получения жизнеспособных клеток из операционного материала. Это помогло получить новые данные по механизмам гибели клеток при ишемии/реперфузии во время операций лифтинга лица. Данная методика может быть эффективно использована и при решении других актуальных задач, требующих получения культур жизнеспособных клеток из органов и тканей человека.

Автором впервые дана комплексная оценка аутофагии, апоптоза и некроптоза в клетках кожи и подкожно-жировой клетчатки при ишемии/реперфузии во время операций по коррекции контуров лица. Полученные данные позволят выработать оптимальную тактику воздействия на сигнальные пути исследуемых клеток с целью минимизации

послеоперационных осложнений и более эффективного заживления послеоперационной раны.

Впервые показано, что загар, полученный в течение трех недель перед операцией, активирует сигнальные пути гибели клеток кожи и подкожно-жировой клетчатки при ишемии/реперфузии при лифтинге лица. Полученные данные позволят оптимизировать сроки операции у пациенток, получивших свежий загар.

Полученные Абрамяном Ш.М. данные свидетельствуют о важности санации полости рта перед операцией лифтинга лица, что необходимо учитывать при планировании подобных операций.

В своём исследовании Абрамян Ш.М. коснулся проблемы коррекции энергетического статуса клеток в операционном поле при лифтинге лица с помощью цитопротекторов. Полученные результаты показали эффективность такого подхода. Их применение способствовало снижению частоты послеоперационных осложнений и сокращению сроков заживления послеоперационной раны.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты работы Абрамяна Ш.М. могут быть широко использованы, как для проведения дальнейших научных исследований, так и на практике. Так, предложенная Абрамяном Ш.М. усовершенствованная методика получения первичной культуры жизнеспособных клеток из образцов ткани при проведении операции может быть широко использована в решении подобных задач при различных других исследованиях. Данные по активации сигнальных путей апоптоза, в том числе индуцированного, а также некроптоза, могут лечь в основу разработки технологий воздействия на них с целью уменьшения риска послеоперационных осложнений.

Полученные Абрамяном Ш.М. данные об активации сигнальных путей апоптоза и некроптоза во время операции при недавно полученном загаре

свидетельствуют о необходимости учитывать этот факт при определении сроков подобных оперативных вмешательств.

На основании полученных данных можно сделать вывод о необходимости более тщательного подхода к санации полости рта перед проведением подобных операций.

Особую перспективу имеет проведение дальнейших исследований по применению препаратов, повышающих энергетический потенциал митохондрий при проведении оперативных вмешательств, так как полученные Абрамяном Ш.М. пилотные данные свидетельствуют об уменьшении послеоперационных осложнений и сокращении сроков заживления послеоперационной раны.

Некоторые результаты исследования уже внедрены в практику предоперационной подготовки пациентов в Клинике пластической хирургии и косметологии профессора Блохина и доктора Вульфа ООО «Фрау Клиник», г. Москва, а также в план преподавания в Учебном Центре профессора Блохина и доктора Вульфа, Москва.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, оценка ее завершенности

В целом диссертация Ш.М. Абрамяна является законченным исследованием, предоставляет решение актуальных задач, обеспечивающих достижение поставленной цели работы. Диссертация выполнена в соответствии с требованиями ВАК Минобрнауки России и изложена по традиционному плану на 183 страницах, содержит 17 рисунков и 54 таблицы. Работа состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием пациентов, материалов и методов исследования, главы собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы. Список литературы включает 375 источников: 46 на русском и 329 на иностранных языках.

Во введении обоснованно изложены вопросы актуальности проблемы, сформулированы цели и задачи исследования, четко обозначена новизна полученных результатов, их практическая и теоретическая значимость.

В первой главе автором представлен обзор современных литературных данных по тематике исследования – возникновение состояния ишемии/реперфузии при хирургических операциях. Состояние ишемии неизбежно при любой операции, когда снятие лигатуры в конце операции и восстановление кровотока в оперативном поле приводит к серьёзным метаболическим сдвигам, которые ухудшают состояние больного.

Во второй главе автор представляет характеристику группы пациентов, вошедших в исследование, подробно описывает лабораторные методики, примененные в исследовании, методы статистического анализа полученных результатов.

В третьей главе диссертант описывает полученные научные результаты работы. При изучении соотношения популяций клеток, выделенных из операционного материала при лифтинге лица у пациенток разного возраста, автором установлено, что с увеличением возраста происходит истончение кожи - снижается относительное содержание клеток эпителия, а достоверно возрастает относительное содержание адипоцитов. Процент содержания лимфоцитов в коже и подкожно-жировой ткани лица у женщин имел тенденцию к снижению с возрастом. В образцах клеток из тканей, полученных при завершении операции лифтинга лица (~ через 3 ч от начала операции), в которых проявляются последствия ишемии тканей в результате наложения лигатуры, процентное соотношение нейтрофилов значительно возросло по сравнению с её началом, что доказывает влияние состояния ишемии/реперфузии на клетки иммунной системы кожи и подкожно-жирового слоя лица. Процент макрофагов также достоверно повысился в конце операции, то есть при состоянии ишемии/реперфузии, по сравнению с её

началом. Число лимфоцитов в жировой ткани с возрастом снижалось, а в период реперфузии их процент был достоверно выше, чем в контроле.

При изучении фактора солнечного загара (ультрафиолета) на состояние клеток перед операцией было получено, что клетки иммунной системы достоверно реагировали на него: процент нейтрофилов в образцах, выделенных из тканей лица в самом начале операции, достоверно повысился у пациенток после УФ по сравнению с пациентками без загара. Проведение операции лифтинга лица у пациентов после воздействия УФ привели к небольшому увеличению процента макрофагов и лимфоцитов в группах лиц старше 40 лет по сравнению с пациентами без загара.

Автором представлены результаты изучения влияния состояния ишемии/реперфузии на экспрессию внутриклеточных белков, сопряженных с аутофагией, в клетках кожи и подкожно-жировой ткани, выделенных при операции лифтинга лица, в зависимости от возраста пациентов. Показано, что состояние ишемии/реперфузии в конце операции лифтинга лица сопровождается активацией процессов аутофагии в клетках кожи и подкожно-жировой ткани, а также в лимфоцитах и нейтрофилах; что экспрессия маркеров аутофагии снижается с возрастом, у лиц старше 50 лет эти показатели достоверно отличаются от показателей лиц моложе 30 лет.

Представлены данные автора по изучению апоптоза в клетках кожи и подкожно-жировой ткани при лифтинге лица, которые демонстрируют, что в контрольных клетках, выделенных из тканей лица в начале операции, процент спонтанного апоптоза низкий, зависит от типа клеток, но не зависит от возраста пациентов. Самый высокий процент спонтанного апоптоза зарегистрирован в эпителиальных клетках кожи. Процент С2-церамид-индуцированного апоптоза в контрольных клетках был достоверно выше по сравнению с уровнем спонтанного апоптоза, показатели которого достоверно повышаются с возрастом.

В данной работе было также показано, при измерении уровней экспрессии рецепторов апоптоза и каспаз в клетках лица зарегистрировано достоверное повышение экспрессии рецепторов CD95 (FAS/Apo-1) и первого рецептора TNF- α – TNF-R1, при состоянии реперфузии по сравнению с данными в начале операции лифтинга лица (контроль). У лиц старше 50 лет достоверно выше были показатели экспрессии рецепторов апоптоза, чем у лиц моложе 30 лет как в контроле, так и при состоянии реперфузии.

Уровни экспрессии каспаз-3, -2 и -9 были достоверно повышены при состоянии реперфузии по сравнению с контрольными клетками, выделенными в начале операции лифтинга лица, при этом у пациентов старше 40 лет активность каспаз была достоверно выше, чем у лиц моложе 30 лет как в контроле, так и при состоянии реперфузии.

При изучении энергетического потенциала митохондрий клеток при операции лифтинга установлено, что в состоянии ишемии/реперфузии достоверно была повышена экспрессия белков митохондрий, сопряжённых с апоптозом по сравнению с контрольными клетками; выявлено достоверное повышение уровня экспрессии белков Bid, Bim, Bax и Bak в клетках, выделенных в конце операции, что указывает на роль этих белков в гибели клеток кожи после состояния ишемии. Экспрессия белка Bad не зависела от состояния ишемии/реперфузии, а экспрессия Bid была повышена в конце операции, что указывает на митохондриальный тип апоптоза при ишемии/реперфузии.

Проведено исследование клеток иммунной системы полости рта у пациентов с хронической патологией зубов для изучения влияния хронической патологии зубов на послеоперационные осложнения после лифтинга лица. Установлено, что процент нейтрофилов (CD16+) был повышен при кариесе дентина, пульпите и хроническом периодонтите, а уровень естественной гибели нейтрофилов (апоптоз) при пульпите и хроническом периодонтите был достоверно выше по сравнению со здоровыми зубами, гибель моноцитов не

отличалась от контрольного уровня, гибель лимфоцитов была достоверно выше при пульпите и периодонтите с тенденцией к повышению при кариесе и клиновидном дефекте. Показатели индуцированного апоптоза нейтрофилов при пульпите, кариесе дентина и хроническом периодонтите были достоверно выше по сравнению со здоровыми лицами. Для лимфоцитов и моноцитов различия в уровне апоптоза были достоверны для пульпита и хронического периодонтита. Для клеток эпителия при всех заболеваниях имелись достоверные различия по сравнению с нормой. Несмотря на санацию зубов перед операцией, у пациентов с хроническим пульпитом и периодонтитом процент осложнений был выше, чем у пациентов без патологии зубов.

Проведено пилотное исследование на добровольцах, которые в течение 3 недель до начала операции лифтинга лица принимала препараты, повышающие энергетический потенциал митохондрий. При анализе послеоперационного состояния данных пациентов получено снижение числа осложнений и укорочение послеоперационного периода - первые обнадеживающие результаты по возможности купирования негативных последствий ишемии/реперфузии терапевтическими способами.

В целом диссертация Ш.М. Абрамяна является законченным исследованием, представляет решение актуальных задач, обеспечивающих достижение поставленной цели работы.

Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам, что характеризует завершенность работы.

Автореферат диссертации достаточно полно отражает содержание и основные результаты исследования.

Результаты диссертационного исследования были представлены в виде докладов на региональных научных мероприятиях и конференциях с международным участием. По материалам диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 5 в изданиях, рекомендованных ВАК.

Диссертационная работа написана грамотным научным литературным языком и производит положительное впечатление. К достоинствам представленной научной работы необходимо отнести методичность и детальность изложения материала, наглядность демонстрации данных в таблицах и рисунках, логичность и последовательность формулировки выводов.

Замечания по диссертационной работе

Принципиальных замечаний по структуре диссертации, использованным материалам и методам, изложению полученных результатов и содержанию работы нет.

В плане научной дискуссии хотелось бы задать автору следующие вопросы.

1. Насколько выделенные Вами при операции клетки отражают то состояние, которое описано как ишемия/реперфузия в тканях?
2. Чем определялся выбор представленных в работе видов клеточной гибели, так как их на самом деле гораздо больше, чем 3 описанных Вами?

Заключение

Диссертация Абрамяна Шмавона Маисовича «Механизмы гибели клеток при ишемии/реперфузии тканей при пластических операциях по коррекции контуров лица», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.3 Патологическая физиология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача – описаны механизмы клеточной гибели при состоянии ишемии/реперфузии при операциях на лице (лифтинг), даны рекомендации по профилактике осложнений оперативного лечения и особенностей предоперационной подготовки. Диссертационная работа соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК Минобрнауки РФ (Постановление Правительства РФ от

