

С. В. Коротков
5.06.2026 С.В. Коротков

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора, заместителя директора по хирургической помощи ГУ «Республиканский научно-практический центр «Кардиология» Спиридонова Сергея Викторовича на диссертацию Короткова Сергея Владимировича на тему «Иммунотолерантность и иммуносупрессивная терапия при трансплантации печени», представленную на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

Соответствие диссертации специальностям и отрасли науки, по которым она представлена к защите

Представленная диссертационная работа Короткова С.В. по своему содержанию, методологии, объекту и предмету исследования, а также полученным научным результатам полностью соответствует паспорту специальности 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы (медицинские науки):

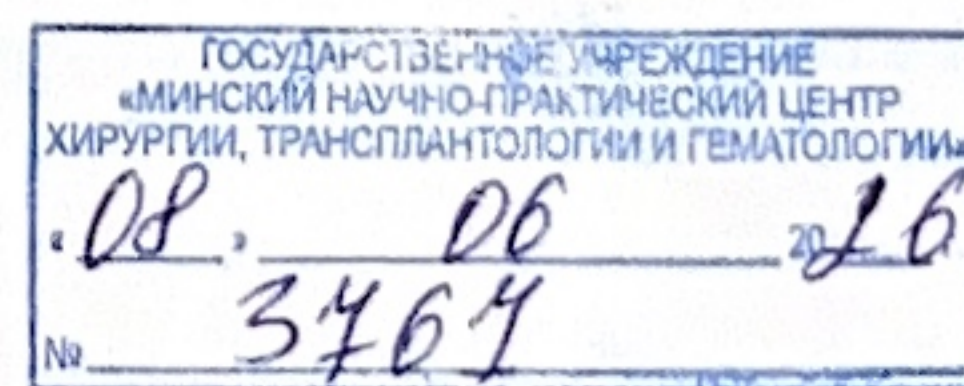
п. 6. Разработка методов клеточной трансплантации и системы удаления дефектных клеток, направлений клеточной инженерии, реконструкции тканей и органов человека с использованием сложных композиций клеточного материала и биологических или синтетических субстанций (биопринтинг, терапевтическое клонирование, бионическая тканевая инженерия, метод клеточных листов и др.). Исследования по генной терапии с использованием выращенных вне организма аутологичных и аллогенных клеток.

п. 8. Изучение особенностей взаимодействия искусственных органов или донорских биологических трансплантатов с собственными системами жизнеобеспечения реципиента. Изучение этиологии, патогенеза, профилактики и коррекции патологических реакций, связанных с биологической несовместимостью органов и тканей реципиента при внедрении в него чужеродных клеток и тканевых структур.

п. 13. Профилактика и лечение осложнений при/после трансплантации органов и тканей.

п. 14. Профилактика, прогнозирование и лечение реакции отторжения донорских органов и тканей.

Диссертация решает актуальную для трансплантации солидных органов задачу – достижение баланса между предотвращением иммунологического конфликта и минимизацией токсических эффектов пожизненной иммуносупрессии.



Актуальность темы диссертации

Диссертационное исследование посвящено решению одной из центральных проблем современной клинической трансплантологии – проблемы побочных эффектов иммуносупрессивных препаратов при необходимости обеспечения пожизненной защиты аллотрансплантата от отторжения.

Ингибиторы кальциневрина (ИКН), составляющие основу протоколов иммуносупрессии при трансплантации всех солидных органов, демонстрируют высокую эффективность в предотвращении острого и хронического отторжения. Однако их применение неизбежно сопряжено с развитием токсических эффектов, среди которых нефротоксичность занимает ведущее место. При трансплантации печени данная проблема приобретает особую остроту в связи с высокой частотой периоперационного острого почечного повреждения (ОПП), обусловленного как хирургической травмой и массивной кровопотерей, так и исходной дисфункцией почек у пациентов с декомпенсированным циррозом печени.

Проблема нефротоксичности ИКН является универсальной для всей органной трансплантологии. Попытки минимизации дозировок такролимуса или циклоспорина неизменно приводят к увеличению риска острого клеточного и гуморального отторжения, что делает традиционные подходы к иммуносупрессии тупиковыми.

В этом контексте разработка альтернативных стратегий иммуносупрессии с использованием клеточных технологий представляется крайне перспективным направлением. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), обладающие выраженными иммуномодулирующими свойствами, могут стать тем инструментом, который позволит разорвать порочный круг «эффективная иммуносупрессия – токсичность».

Особую актуальность работе придаёт отсутствие в мировой практике стандартизированных протоколов применения МСК при трансплантации солидных органов. До настоящего времени не определены оптимальные способы введения клеточного продукта, дозировки, кратность введений, показания к назначению клеточной терапии и критерии оценки её эффективности. Не изучены механизмы формирования иммунологической толерантности под влиянием МСК и не валидированы биомаркеры, позволяющие объективно оценить иммунологический статус реципиента без проведения инвазивной биопсии трансплантата.

Степень новизны результатов диссертации и научных положений, выносимых на защиту

Научная новизна диссертационного исследования не вызывает сомнений и определяется оригинальностью впервые полученных результатов.

Впервые подтверждена эффективность и доказана безопасность локального и системного применения мезенхимальных стволовых клеток.

Разработаны 3 оригинальных метода с чёткими показаниями к назначению:

1. метод индукции иммуносупрессии с комбинированным локальным и системным введением МСК у пациентов группы риска развития ОПП;
2. метод клеточной терапии периоперационного ОПП;
3. метод клеточной терапии такролимус-индуцированного ОПП.

Каждый из разработанных методов представляет собой детально проработанный протокол с указанием доз, способов введения, кратности и сроков применения клеточного продукта, а также алгоритмов коррекции проводимой иммуносупрессивной терапии.

Новизна работы определяется детальным изучением иммунологических механизмов формирования толерантного фенотипа под влиянием МСК. Впервые при трансплантации печени проведено комплексное исследование динамики более 20 субпопуляций лимфоцитов и дендритных клеток методом многоцветной проточной цитофлюориметрии. Установлено, что формирование толерогенного иммунофенотипа характеризуется не просто общим подавлением иммунного ответа, а специфическим перераспределением иммунокомпетентных клеток с активацией супрессорного звена (регуляторных Т- и В-лимфоцитов, В1а-клеток) при одновременном подавлении эффекторных субпопуляций (эффекторных клеток памяти Т-хелперных лимфоцитов, ЕК-клеток, МЗВ-клеток). Данные изменения носят устойчивый характер и сохраняются в отдалённом периоде после трансплантации, что объясняет долгосрочный иммуномодулирующий эффект клеточной терапии, проведённой в раннем послеоперационном периоде.

Впервые проведён многофакторный анализ периоперационных и послеоперационных факторов риска развития ОПП при трансплантации печени. С использованием ROC-анализа определены пороговые значения для интраоперационной кровопотери (≥ 1200 мл, чувствительность 90,48%, специфичность 93,75%) и тяжести цирроза печени (≥ 10 баллов по шкале Child-Pugh, чувствительность 84,62%, специфичность 96,77%), обладающие высокой прогностической ценностью. Введение автором концепции «континуума почечного повреждения» при трансплантации печени, включающего периоперационное ОПП, такролимус-индуцированное ОПП и хроническую болезнь почек, позволяет системно подойти к проблеме нефропротекции у реципиентов печёночного трансплантата на всех этапах посттрансплантационного периода.

Принципиально новым является разработка и валидация молекулярно-генетических и иммунофенотипических биомаркеров иммунологической

толерантности. Установлено, что экспрессия гена ИЛ-4 $\geq 0,5$ AU (чувствительность 85,71%, специфичность 83,87%, AUC 0,839) и абсолютное количество CD3+CD8+TEMRA-лимфоцитов $< 0,1882 \times 10^9/\text{л}$ (чувствительность 73,33%, специфичность 96,55%, AUC 0,855) являются надёжными критериями формирования иммунологической толерантности и позволяют выявлять субклинические формы хронического отторжения без проведения биопсии трансплантата. Данные биомаркеры открывают возможности для неинвазивного мониторинга иммунологического статуса реципиента и персонализированной коррекции иммуносупрессивной терапии.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений и подтверждается высоким методологическим уровнем, использованием современных методов исследования и адекватной статистической обработкой данных.

Диссертационная работа характеризуется корректностью дизайна исследования. Автором реализован комплекс различных типов исследований, каждое из которых соответствует поставленным задачам: интервенционные проспективные рандомизированные контролируемые исследования для оценки эффективности различных способов применения МСК; наблюдательные ретроспективные аналитические исследования для определения факторов риска ОПП; ретроспективное поперечное аналитическое сравнительное исследование для оценки отдалённых результатов; наблюдательное ретроспективное исследование для разработки биомаркеров иммунологической толерантности.

Корректность методологии также подтверждается: чёткостью критериев включения, невключения и исключения пациентов, что обеспечивает формирование однородных групп наблюдения; сопоставимостью групп по основным клинико-демографическим характеристикам; рандомизацией пациентов в проспективных исследованиях, что обеспечивает минимизацию систематических ошибок отбора; использованием валидированных международных шкал и классификаций (KDIGO, Child-Pugh, Banff), что обеспечивает стандартизацию оценки результатов и возможность сравнения с данными других исследователей.

В работе, для реализации поставленных задач, были применены современные методы исследования: проточная цитофлюориметрия с оценкой более 20 субпопуляций лимфоцитов и дендритных клеток; молекулярно-цитогенетическое исследование методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH); количественная оценка экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени; иммуногистохимическое исследование экспрессии матриксной

металлопротеиназы-10 в биоптатах трансплантата; определение уровня анти-НЛА антител II класса методом Lumipex.

Статистическая достоверность результатов обеспечивается применением современных адекватных методов биостатистического анализа с использованием профессиональных программных пакетов Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США) и MedCalc 11.0 (MedCalc, Бельгия). Автором корректно применены следующие методы статистического анализа: непараметрические критерии (критерий Манна–Уитни, точный критерий Фишера) для сравнения групп по количественным и качественным признакам; корреляционный анализ по Спирмену для оценки взаимосвязи между показателями; ROC-анализ для определения пороговых значений диагностических и прогностических критериев с расчётом площади под кривой (AUC), чувствительности и специфичности; анализ выживаемости методом Каплана–Мейера с оценкой статистической значимости различий по Long-Rank критерию.

Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию

Научная значимость исследования заключается в разработке новых методов иммуносупрессивной терапии с применением МСК и обоснованием их дифференцированного применения при трансплантации печени; в установлении закономерностей формирования иммунотолерантного фенотипа, характеризующегося достоверным снижением эффекторных Т-хелперных клеток памяти, естественных киллеров, В-лимфоцитов и повышением регуляторных Т- и В-клеток; в доказательстве методом FISH миграции МСК в печёночный трансплантат; в определении независимых факторов риска развития ОПП и, соответственно, определении чётких показаний к назначению терапии МСК; в установлении молекулярно-генетических биомаркеров иммунологической толерантности (экспрессии гена ИЛ-4 и абсолютного количества терминально-дифференцированных эффекторных Т-цитотоксических клеток памяти); в доказательстве пролонгированного иммуносупрессивного эффекта МСК, характеризующегося снижением частоты иммунологической дисфункции трансплантата с 40% до 22% ($p=0,02$), уменьшение частоты образования de novo анти-НЛА антител с 20% до 5% ($p=0,007$), возможностью поддержания базовой иммуносупрессии такролимусом на более низком уровне.

Наиболее значимым подтверждением практической ценности исследования является включение разработанных методов в клинический протокол Министерства здравоохранения Республики Беларусь «Трансплантация печени (взрослое и детское население)», утверждённый

постановлением Совета Министров Республики Беларусь № 31 от 13.02.2023. Практическая значимость также подтверждается утверждёнными Министерством здравоохранения Республики Беларусь тремя инструкциями по применению и получением патента на изобретение.

Необходимо подчеркнуть универсальную значимость полученных результатов для всей органной трансплантологии. Проблема нефротоксичности ингибиторов кальциневрина является общей для трансплантации всех солидных органов. Разработанная автором концепция применения мезенхимальных стволовых клеток для нефропротекции и индукции иммунологической толерантности может быть экстраполирована на трансплантацию сердца, лёгких, почек и поджелудочной железы.

Экономическая эффективность внедрения разработанной стратегии иммуносупрессивной терапии определяется снижением затрат на лечение вследствие сокращения продолжительности госпитализации и пребывания пациентов в отделении интенсивной терапии, уменьшения частоты развития ОПП, за счёт прямой экономии стоимости пожизненной иммуносупрессивной терапии и лечения кризов отторжения, уменьшения количества протокольных биопсий и снижения частоты развития хронической болезни почек (с 68,2% до 23,4%).

Социальная значимость результатов исследования определяется улучшением качества жизни реципиентов печёночного трансплантата за счёт снижения частоты и тяжести побочных эффектов иммуносупрессивной терапии (хроническая болезнь почек, сахарный диабет, артериальная гипертензия, онкологические заболевания, оппортунистические инфекции).

Опубликованность результатов диссертации в научной печати

По теме диссертационного исследования опубликовано 34 научные работы, в том числе: 18 статей в научных рецензируемых журналах, соответствующих требованиям п. 19 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, из них 16 статей опубликованы в изданиях Республики Беларусь, 2 статьи – в зарубежных журналах; 2 статьи в сборниках научных трудов; 9 работ в сборниках тезисов докладов и материалов конференций; 3 инструкции по применению, утверждённые Министерством здравоохранения Республики Беларусь; 1 патент на изобретение. Результаты диссертации включены в клинический протокол Министерства здравоохранения Республики Беларусь «Трансплантация печени (взрослое и детское население)» (утв. пост. Совета Министров Республики Беларусь № 31 13.02.2023). Объём публикаций в рецензируемых изданиях - 14,07 авторских листа.

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК

Диссертационная работа С.В. Короткова «Иммунологическая толерантность и иммуносупрессивная терапия при трансплантации печени» изложена на 235 страницах и имеет структуру, соответствующую требованиям ВАК Республики Беларусь. Структура диссертации включает: введение, общую характеристику работы, главу аналитического обзора литературы, главу, посвящённую материалам и методам исследования, 8 глав с изложением результатов собственных исследований, заключение, библиографический список, 5 приложений. Работа содержит 84 таблицы на 33 страницах и 22 рисунка на 10 страницах, что обеспечивает наглядность представления результатов исследования. Библиографический список включает 354 использованных литературных источника и 34 публикации соискателя.

Замечания и вопросы по диссертации

1. В диссертации детально изучены иммунологические механизмы действия МСК при трансплантации печени. Механизмы нефропротективного эффекта мезенхимальных стволовых клеток требуют уточнения. Является ли нефропротекция следствием отсроченного назначения и минимизации дозы такролимуса? Проводилось ли морфологическое исследование почечной ткани у пациентов, получивших клеточную терапию?

2. Мезенхимальные стволовые клетки обладают не только иммуномодулирующими, но и регенераторными свойствами. Изучалось ли влияние МСК на процессы репарации и регенерации печёночной ткани при ишемически-реперфузионном повреждении?

Необходимо отметить, что заданные вопросы не носят принципиального характера и не снижают научной и практической значимости диссертационной работы.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Представленная к защите диссертационная работа С.В. Короткова выполнена на высоком методологическом уровне, что свидетельствует о высокой научной квалификации автора как исследователя, способного самостоятельно формулировать и решать крупные научные проблемы в области трансплантологии.

Объём выполненного исследования, включающего комплекс проспективных рандомизированных контролируемых и ретроспективных аналитических исследований с применением современных высокоинформативных методов (многоцветная проточная цитофлюориметрия, молекулярно-цитогенетические исследования,

количественная оценка экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени, иммуногистохимические исследования), корректность статистической обработки данных с использованием адекватных методов биостатистического анализа, всесторонний анализ полученных результатов и их аргументированное обсуждение в контексте современных мировых научных данных, а также существенный личный вклад автора в получение и интерпретацию результатов исследования свидетельствуют о том, что научная квалификация С.В. Короткова в полной мере соответствует требованиям, предъявляемым к соискателям ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы.

Заключение

Изучение представленной диссертации, автореферата и публикаций соискателя позволяет констатировать, что диссертационная работа Короткова Сергея Владимировича «Иммунотолерантность и иммуносупрессивная терапия при трансплантации печени» является завершённым самостоятельно выполненным научным исследованием, соответствующим требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям.

Учёную степень доктора медицинских наук по специальности 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы Короткову Сергею Владимировичу можно присудить за:

1. Установление и научное обоснование закономерностей формирования толерогенного иммунофенотипа при использовании мезенхимальных стволовых клеток у реципиентов печёночного трансплантата, характеризующихся перераспределением иммунокомпетентных клеток периферической крови с активацией супрессорного звена иммунитета (регуляторных Т- и В-лимфоцитов, В1-клеток) при одновременном подавлении эффекторных субпопуляций (CD3+CD4+TEM-лимфоцитов, ЕК-клеток, МЗВ-клеток), что создаёт основу для персонифицированного подхода к иммуносупрессивной терапии и прогнозирования отдалённых результатов трансплантации.

2. Разработку и научное обоснование дифференцированной стратегии иммуносупрессивной терапии с применением мезенхимальных стволовых клеток у реципиентов печёночного трансплантата, включающей:

- 1) метод индукции иммуносупрессии с использованием комбинированного (локального внутрипортального и системного внутривенного) введения МСК у пациентов группы риска развития острого почечного повреждения;
- 2) метод иммуносупрессивной терапии при развитии периоперационного острого почечного повреждения;

3) метод иммуносупрессивной терапии при развитии такролимус-индуцированного острого почечного повреждения, обеспечивающих ускоренное восстановление почечной функции за счёт отсроченного назначения и минимизации дозы ингибиторов кальциневрина без увеличения риска иммунологической дисфункции трансплантата.

3. Определение показаний к проведению клеточной терапии мезенхимальными стволовыми клетками у реципиентов печёночного трансплантата на всех этапах госпитального периода трансплантации печени на основании многофакторного анализа периоперационных факторов риска развития острого почечного повреждения с установлением пороговых значений для интраоперационной кровопотери (≥ 1200 мл) и тяжести цирроза печени (≥ 10 баллов по шкале Child-Pugh).

4. Доказательство безопасности и эффективности методов локального (внутрипортального интраоперационного) и системного (внутривенного) применения мезенхимальных стволовых клеток при трансплантации печени с верификацией присутствия введённых клеток в паренхиме трансплантата.

5. Доказательство долгосрочного иммуномодулирующего эффекта при применении МСК в раннем послеоперационном периоде, проявляющегося снижением частоты иммунологической дисфункции трансплантата в 1,8 раза, уменьшением образования de novo анти-HLA антител в 4 раза, возможностью безопасной минимизации дозы ингибиторов кальциневрина на 25% и снижением частоты развития хронической болезни почек в 3 раза.

6. Разработку и валидацию биомаркеров иммунологической толерантности (экспрессия гена ИЛ-4 и абсолютное количество CD3+CD8+TEMRA-лимфоцитов), позволяющих проводить неинвазивную диагностику хронического отторжения трансплантата и выявлять его субклинические формы на ранних этапах, что обеспечивает своевременную коррекцию иммуносупрессивной терапии и предотвращает развитие необратимого повреждения трансплантата.

д.м.н., доктор медицинских наук, профессор,
Министерство здравоохранения
Республики Беларусь
заместитель директора по хирургической
ЦЕНТР «КАРДИОЛОГИЯ»
Помощи ГУ «Республиканский научно-
практический центр «Кардиология»

Число 08.06.2026

Подпись _____

С.В. Спиридонов