

## ОТЗЫВ

официального оппонента Новожилова Владимира Александровича, доктора медицинских наук по специальности 3.1.11. (14.01.19) - детская хирургия, главного врача Областного государственного автономного учреждения здравоохранения «Городская Ивано-Матренинская детская клиническая больница» Министерства здравоохранения Иркутской области на диссертационное исследование Хасанова Расуля Ринатовича на тему «Экспериментально-клиническое обоснование новых стратегических подходов лечения детей с синдромом короткой кишки», представленное на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.11. (14.01.19) – детская хирургия

### Актуальность избранной темы

Синдром короткой кишки (СКК) – тяжёлое заболевание, обусловленное уменьшением всасывательной поверхности тонкой кишки, возникающее в результате обширных резекций тонкой кишки, приводящее к хронической кишечной недостаточности.

Лечение пациентов с синдромом короткой кишки - чрезвычайно сложная и до сих пор до конца не изученная проблема. Количество пациентов, страдающих синдромом короткой, кишки неуклонно возрастает. Это связано с совершенствованием технологий выхаживания младенцев, развитием системы парентерального питания, реанимационного обеспечения. Современные возможности реанимационных и неонатологических отделений позволяют выхаживать младенцев с низкой и экстремально низкой массой тела. Зачастую некротизирующий энтероколит развивается молниеносно, поэтому на практике хирурги встречаются с запущенными случаями, требующих выполнения обширных резекций кишечника. Другой причиной развития кишечной недостаточности являются врожденные пороки развития - гастрошизис, синдром Ледда, множественные атрезии и др. Этому свидетельствует постоянное обсуждение данной темы отечественными и зарубежными авторами в медицинской периодике, подготовка учебно-методических пособий и статей.

Несмотря на очевидные успехи в лечении детей с синдромом короткой кишки, до настоящего времени остаются нерешенными вопросы, связанные адаптационными механизмами желудочно-кишечного тракта, не определены тактические решения при выборе методов удлиняющих операций. Остается до конца нерешенной проблема сроков выполнения оперативных вмешательств и оптимального выбора хирургических вариантов лечения. Недостаточно полно отражены возможности использования программ диагностического изображения кишечника после обширных резекций, включая ультрасонографию, рентген-изображение, компьютерную и магнитно-резонансную томографию.

Бурное развитие биоинженерии с позиций технологий 21 века определяют возможности в искусственном создании органоспецифичных тканей для моделирования утраченных анатомических структур, в том числе и для кишечной трубки. Однако существующие направления исследований до сих пор

не решают задачи по моделированию иннервируемого мышечного комплекса кишечной стенки.

В мировой литературе имеются публикации, отражающие технологии создания гладкомышечной ткани кишечника на основе двухмерного матрикса, однако генерирование пространственного трехмерного нервно-мышечного волокна до сих пор остается исследовательской перспективой.

Стратегической целью лечения СКК является наиболее ранее восстановление функции кишечника с переводом пациентов на полное энтеральное питание, что определяет перспективы благоприятного прогноза лечения у данного контингента больных

Таким образом, высокие цифры летальности и инвалидизации пациентов с синдромом короткой кишки, колоссальные финансовые затраты на обеспечение лечебного процесса, проблемы социальной адаптации детей, сложность темы и значительный перечень нерешенных вопросов определяют актуальность диссертационного исследования Хасанова Расуля Ринатовича.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна.**

Работа основана на экспериментальном исследовании животных, а также многолетних клинических наблюдений. Дизайн клинической части носит ретроспективный и проспективный характер с историческим контролем. Дизайн экспериментального сектора - проспективное, контролируемое исследование.

Автором анализировалась медицинская документация, изучался анамнез пациентов, рассматривались сведения о состоянии общего развития и питания пациентов (до- и после удлиняющих кишечник операций), изучались выполненные операции, длина удаленной и оставшейся части тонкой и толстой кишки и др.

Статистические исследования проводились с использованием комплекса современной математико-статистической обработки, которая выполнялась по общепринятым методам вариационной статистики и корреляционного анализа с использованием программ Excel (Версия 16.30) и JMP 13.0 (SAS). Нормальность распределения данных оценивали визуально по диаграммам распределения и при помощи и теста Шапиро-Вилка (Shapiro-Wilk test). При нормальном распределении данных описательную характеристику результатов проводили при помощи среднего и стандартного отклонения и записывали в тексте как:  $\mu$  (среднее)  $\pm$  s (стандартное отклонение). При сравнении таких данных использовался критерий Стюдента (t-test).

При ненормальном распределении показатели описывались при помощи медианы и 25-ого и 75-ого перцентилей и записывалось в тексте как: медиана (25 перцентиль; 75 перцентиль). Сравнение таких данных производилось при помощи непараметрического критерия Уилкоксона (Wilcoxon 2-Sample Test), который также называется Манн-Уитни Тест (Mann-Whitney Test). Для оценки

силы взаимосвязи между параметрами применялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Для достижения основной цели работы, автором проведено экспериментальное исследование на 22 лабораторных крысах с распределением их на группы. В результате изучения патоморфологического материала было доказано, что дилатация кишки и гипертрофия мышечного слоя кишечной стенки у животных носит адаптационный характер, что подтверждено сравнительным исследованием биоптатов тонкой кишки пациентов с короткой кишкой и пациентов с нормальной длиной тонкой кишки и клиническими наблюдениями за 54 пациентами с синдромом короткой кишки.

Для изучения диагностической ценности методов интроскопии автором проведено подробное изучение данных ультразвукового, рентгенологического исследования, а также данных магнитно-резонансной томографии. Диссертантом определены точность, чувствительность и диагностическая ценность каждого метода исследования, а также показания и противопоказания к их выполнению.

В части клинического сектора диссертации, на основании непосредственных и отдалённых результатов определены показания и противопоказания к различным типам удлиняющих кишечник операций. Кроме того, изучено влияние удлиняющих кишечник операции, длинны тонкой кишки, наличия илиоцекального клапана, толстой кишки и редилатации тонкой кишки на восстановление энтерального питания у пациентов с синдромом короткой кишки в отдалённом периоде. Проведён анализ Каплана-Мейера.

Во втором эксперименте автором разработаны методы создания нервно-мышечного комплекса кишечника при помощи тканевой инженерии.

Новизна работы заключается в создании на основании экспериментальных исследований иннервируемого гладкомышечного волокна, которое имеет способность к перистальтическому сокращению, что делает перспективным использование технологий тканевой инженерии в моделировании искусственной кишечной трубки. С хирургических позиций обоснована целесообразность удлиняющих кишечник операций у детей в зависимости от наличия или отсутствия толстой кишки, илеоцекального клапана, протяженности оставшейся части тонкой кишки.

Достоверность полученных автором результатов исследования подтверждена достаточным количеством клинических наблюдений (54 пациента с СКК) и данными экспериментальной части. Выводы научной работы сформулированы точно и по информационно-смысловой нагрузке соответствуют поставленным задачам. Практические рекомендации составлены корректно, аргументированы на основании полученных результатов, представляют научный интерес для теории и практики.

Результаты работы доложены на конгрессе немецкого общества детской гастроэнтерологии и питания (Гайдельберг, Германия, 2013), конгрессе немецкого общества по нейрогастроэнтерологии (Фрайзинг, Германия, 2014), 18-ом немецком конгрессе хирургических научных исследований (Ганновер, Германия, 2014), XIII Российском конгрессе «Инновационные технологии в

педиатрии и детской хирургии» (Москва, 2014), съезде детских хирургов России (Москва, 2015), 2-ой конференции международной Федерации по нейрогастроэнтерологии (Сан-Франциско, США, 2016), 20-ой конференции «Дни исследований в хирургии» от немецкого общества по Хирургии (Магдебург, Германия, 2016), 82-ой Всероссийской научной конференции студентов и молодых учёных «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2017), 24-ом ежегодном конгрессе немецкого общества по нейрогастроэнтерологии (Фрайзинг, Германия, 2017), серии избранных лекций медицинского факультета Мангейм (Мангейм, Германия, 2017), 3-м конгрессе детских хирургов России (Москва, 2017), 47-ом международном симпозиуме по детской хирургии (Обергургль, Австрия, 2018), 25-ом ежегодном конгрессе немецкого общества по нейрогастроэнтерологии (Фрайзинг, Германия, 2018), 5-ом международном симпозиуме «Развитие энтеральной нервной системы: сигналы, гены, терапия» (Бостон, США, 2018), 3-ей конференции международной Федерации по нейрогастроэнтерологии (Амстердам, Нидерланды, 2018), 56-ой конференции по детской хирургии в рамках немецкого конгресса по детской и подростковой медицине (Лейпциг, Германия, 2018), 26-ой Конференции немецкого общества нейрогастроэнтерологии (Берлин, Германия, 2019), 5-ом Форуме детских хирургов России (Уфа, 2019), 57-ом Конгрессе немецкой ассоциации детских хирургов в рамках конгресса по педиатрии (Мюнхен, Германия, 2019), 27-ом ежегодном конгрессе немецкого общества по нейрогастроэнтерологии (Фрайзинг, Германия, 2020), круглом столе по синдрому короткой кишки организованном Российской ассоциацией детских хирургов (Москва, 2020).

### **Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций.**

Практическая значимость диссертационного исследования заключается в определении показаний к различным видам удлиняющих кишечник операций на основании сохраненных морфологических структур кишечной трубки, определены диагностические параметры используемых методов диагностики состояния желудочно-кишечного тракта - УЗИ, рентген-контрастного исследования и магнитно-резонансной томографии. На основании диссертационного исследования показано, что удлиняющие технологии при синдроме короткой кишки целесообразно применять после года, так как на протяжении первого года жизни у ребёнка происходит интенсивный рост кишечника, который может быть нарушен проведённой удлиняющей операцией.

Автором разработан метод выращивания клеток межмышечного нервного сплетения в трёхмерном матриксе, которые формируют связи в трёхмерной среде и образуют нервные сплетения, играющие ключевую роль для перистальтики биоинженерного мышечного слоя. Метод выращивания иннервированного, способного к сокращениям мышечного слоя тонкой кишки позволяет создать иннервированный мышечный слой кишечника, способный к сокращениям, обеспечивая тем самым решение одной из важнейших задач

тканевой инженерии кишечника – создание мышечного слоя кишечника, способного к перистальтическим сокращениям.

Разработанные практические рекомендации используются в работе хирургических отделений Республиканской детской клинической больницы (г.Уфа), Городской детской клинической больницы No 17 (г. Уфа). Теоретические положения и практические рекомендации диссертации используются в процессе обучения студентов педиатрического и лечебного факультетов и клинических ординаторов на кафедре детской хирургии с курсом ИДПО ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

По материалам диссертации опубликовано 28 научных работ, в том числе 16 публикаций в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Российской Федерации для публикации материалов диссертационных работ, из них 10 статей в журналах, входящих в перечень ВАК, 2 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексированных в международной базе данных Scopus и 1 статья и 3 тезиса в журналах, индексированных в международной базе данных Web of Science. Всего опубликовано 8 научных работ в зарубежных журналах, индексированных в международных базах данных Scopus, Pubmed, Web of Science. Изданы 2 федеральные клинические рекомендации, одна рецензируемая монография (глава в книге) на английском языке, опубликованная в издательстве Springer (Швейцария) и индексированная в международной базе данных Scopus.

### **Содержание диссертации.**

Работа выполнена не тривиально, исходя из целей и задач исследования. Состоит из введения, 9 глав собственных исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций. Общий объем диссертации 256 страниц машинописного текста, она иллюстрирована 33 таблицами, 65 рисунками. Указатель литературы содержит 394 источника (80 отечественных и 314 зарубежных авторов).

Введение определяет необходимость разработки основных направлений лечения синдрома короткой кишки у детей. Автором формулируются масштабная цель и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту. По пунктам освещается новизна, практическая и теоретическая значимость исследований, что характеризует диссертанта, как сформировавшегося ученого, нацеленного на получение результата. Соответственно, вся работа четко структурирована и логично взаимосвязана.

Литературный обзор посвящен основным аспектам этиологии, эпидемиологии, вопросам парентерального питания, хирургического лечения и проблемам тканевой инженерии при синдроме короткой кишки. Читается эта глава с неподдельным интересом. Красной линией в тексте определяется глобальный подход к решению сложнейших проблем детей с данной патологией.

Во второй главе очень подробно и системно описываются характеристика экспериментальных животных, методы исследования морфологического

материала. В разделе клинических групп - подробно освещаются методы диагностики состояния желудочно-кишечного тракта у пациентов, описываются с использованием иллюстративного материала способы хирургической коррекции синдрома короткой кишки. Очень продуктивно описан раздел по культивированию способного к сокращениям мышечного слоя тонкой кишки. По ходу прочтения этого сектора диссертации возник вопрос. *Чем определяются сроки (10 - 21 день) инкубации клеток? Почему такой разброс по времени?*

*Второй вопрос: как часто встречались пациенты со стенозом анастомоза после первичных реконструктивных операций? И всегда ли в этих случаях наблюдалась дилатация приводящего сегмента тонкой кишки?*

*Третий вопрос: Что или, какие факторы влияют на трансформацию стволовых клеток в энтероциты или нейрциты?*

Глава 3. Посвящена характеристике кишечной адаптации в мышечных слоях и межмышечных нервных сплетениях тонкой кишки. Доказана роль энтеральной нервной системы в процессах адаптации тонкой кишки после обширных резекций. Третья глава - очень важный и интересный раздел, где делается вывод, что процесс адаптации кишечника при СКК взаимосвязан и происходит в трех направлениях - увеличивается диаметр кишки, происходит гипертрофия мышечного слоя и образование клеток энтерального нервного сплетения. В ходе анализа полученных возникает вопрос *о трансформации стволовых клеток в нейрциты.*

Глава 4. Анализируются процессы адаптации кишки в клинических группах. Автором вводится понятие нейро-мышечного комплекса тонкой кишки. Клиническая оценка выполнена путем сравнительного анализа биопсийного материала у пациентов с синдромом короткой кишки, полученного при выполнении удлиняющих и реконструктивных операций, и у условно здоровой группы пациентов с нормальной длиной тонкой кишки, у которых биоптаты были получены при резекции участка тонкой кишки по медицинским показаниям.

При анализе возник вопрос.

*Сколько биоптатов у какого количества пациентов подвергнуты исследованию?*

В конечном итоге автором делается вывод, что увеличение доли стволовых клеток при неизменном количестве нейронов в межмышечных нервных сплетениях свидетельствует об увеличении межмышечных нервных сплетений.

Глава 5. В пятой главе определяются диагностическая ценность, чувствительность и специфичность методов диагностического изображения. Недостаток этого раздела работы заключается в небольшом количестве клинических наблюдений, что в общем не повлияло на очевидные выводы при определении программы комплексного обследования пациентов с СКК. Главный вывод этого раздела диссертации – у пациентов с СКК необходимо использование комплекса лучевых методов диагностики, включающего УЗИ, рентген-контрастирование и МРТ, которые имеют разную значимость для диагностики состояния кишечника, определенную автором.

Глава 6. В этом разделе работы четко сформулированы методы хирургического лечения детей с синдромом короткой кишки, разработан алгоритм выбора способа удлинения кишечника в зависимости от характера патологического процесса в брюшной полости. Исследованы непосредственные результаты лечения. Подробно рассмотрен вопрос о проведении повторных удлиняющих кишечник операциям. Замечаний по этой главе нет.

Глава 7. В главе рассматриваются проблемы нутритивной поддержки пациентов, после реконструктивных операций по поводу СКК. Подчеркивается, что полное энтеральное питание стало возможным в 59% случаев после операции LILT и 42% после STEP. Период адаптации кишечника после удлиняющих операций составляет не менее 10 лет. Весь этот срок пациенты нуждаются в медицинском наблюдении. Для оценки нутритивного статуса с учетом фактора времени диссертантом проведен анализ по Каплан-Майеру. Рассмотрено влияние типа оперативного вмешательства и длины удлиненного участка тонкой кишки на частоту отказа от парентерального питания. В результате доказано, что при удлинении кишки более, чем на 20 см методом LILT потребность в парентеральном питании пропадала наиболее быстро. Наличие илео-цекального клапана и более половины толстой кишки положительно влияет на переход к энтеральному питанию.

В ходе анализа этой главы возник следующий вопрос. *Какие причины развития редилатации тонкой кишки после удлиняющих операций?*

Глава 8. Культивирование межмышечного нервного сплетения в трехмерном матриксе. Необходимость подобного исследования диктуется логическим заключением о необходимости создания иннервируемого мышечного слоя кишечной стенки для создания функционального кишечника. В ходе эксперимента на трехмерном матриксе автором обнаружены большие скопления нейронов, напоминающих нервные сплетения. Исследование проведено с использованием конфокальной микроскопии, позволяющей получать серии изображений на различных глубинах с реконструкцией в 3-D. В конечном итоге автором получен потрясающий воображение результат с использованием тканевой инженерии - выращенная искусственная энтеральная нервная система. Итоги этого исследования делают возможным использование тканевой инженерии в лечении больных с синдромом короткой кишки.

Глава 9. На основании проведенных ранее экспериментальных исследований, диссертантом выполнен следующий логичный шаг - создание мышечного иннервируемого слоя тонкой кишки, способного к перистальтическим сокращениям. В ходе этого эксперимента были изучены взаимосвязи между энтеральной нервной системой и гладкомышечными клетками в созданной мышечной ткани.

Автором определены условия для роста мышечных и клеток энтерального нервного сплетения в трехмерном матриксе, выявлен оптимальный тип расположения клеток - в среднем слое матрикса между расположенным выше и ниже скоплениями мышечных клеток. Полученная система мышечных и нервных клеток обладает свойствами сократительной активности. Эта способность ткани играет ключевую роль в создании искусственной тонкой

кишки. Доказана взаимосвязь между клетками-нейронами и клетками гладкомышечной ткани. Совместное расположение клеток в трехмерной структуре существенно влияет на их пролиферацию. Установлены механизмы, с помощью которых энтеральные нейроны влияют на пролиферацию мышечных клеток при их совместном культивировании. Выявлено, что пролиферация мышечных клеток происходит под влиянием как непосредственного контакта между нервными и мышечными клетками, так и под влиянием паракринных факторов энтеральной нервной системы. Автором сделан вывод, что совместное культивирование энтеральных нейронов и мышечных клеток при правильном их расположении в трехмерном матриксе делает возможным создание интернируемого мышечного слоя, способного к сокращениям. Таким образом биоинженерная тонкая кишка открывает новые перспективы в лечении пациентов с синдромом короткой кишки.

*Однако, несмотря на очевидные успехи, при окончательном рассмотрении итогов остается вопрос о создании полноценного кишечного кондукта с наличием слизистой, иннервируемого и кровоснабжаемого мышечного слоя? Возникает вопрос технической интеграции искусственной ткани кишки в организм пациента.*

Это может являться следующим этапом исследовательских работ, касающихся как фундаментальных вопросов, так и прикладных проблем.

Заключение написано структурно и четко отражает суть проведенного исследования.

Таким образом, диссертация Хасанова Р.Р. написана не стандартно, логически отражает ход проводимых исследований, позволяет ответить на все поставленные задачи с позиций экспериментальной и клинической медицины, подтвержденными статистическими выкладками.

Все ключевые аспекты диссертации наглядно иллюстрированы клиническими примерами, таблицами и фотографиями. Работа освещает широкий круг практических вопросов актуальных для неонатологов, детских хирургов, врачей смежных специальностей. Поставленные задачи в начале исследования логично отражены в выводах и практических рекомендациях. Принципиальных замечаний по выполненной диссертационной работе нет. Вопросы оппонента изложены по ходу текста.

В качестве дискуссии хочется отметить, что эта работа является лишь ступенью к продолжению фундаментальных исследований, касающихся или клинического применения тканевой инженерии в детской хирургии.

### **Заключение.**

Выполненное диссертационное исследование Хасанова Расуля Ринатовича на тему «Экспериментально-клиническое обоснование новых стратегических подходов лечения детей с синдромом короткой кишки», представленное на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.11. (14.01.19) – детская хирургия, является научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенного автором исследования содержится



