

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Малинина Юрия Юрьевича на тему: «Факторы риска, патогенез осложнений, механизмы регуляции гемостаза и пиелонефрита после контактной литотрипсии», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология

Диссертационная работа Малинина Юрия Юрьевича посвящена одной из наиболее актуальных проблем современной урологии – лечению мочекаменной болезни (МКБ), исследованию факторов рисков хирургии МКБ, прогнозированию осложнений, определению механизмов регуляции геморрагии и воспалительных реакций после эндоурологических оперативных вмешательств. Нефролитиаз остается важной проблемой урологии вследствие значительной распространенности, высокого риска обструктивных осложнений, в частности гематурии, острого пиелонефрита, трудностей диагностики этих осложнений на ранних этапах развития, недостаточно эффективного консервативного лечения. Появление эндоскопических технологий не избавило пациентов от послеоперационных осложнений.

Концепция патогенеза гематурии после контактной литотрипсии отсутствует до настоящего времени. При этом рядом авторов отмечена дисрегуляция тромбоцитов у больных с МКБ. Агрегация тромбоцитов (АТц) в значительной степени связана с их количеством и морфологией, сенситивностью рецепторного аппарата плазмолеммы к различным агонистам, состоянием внутриклеточных сигнальных путей. Изучение реактивности Тц является перспективным в выявлении пациентов с высоким риском послеоперационной гематурии, уточнении путей гемостаза, развития пиелонефрита на этапах консервативного и оперативного лечения, а также механизмов его ограничения, что соответствует актуальным направлениям развития современной медицины.

Научная новизна и практическая значимость исследований.

В диссертации Малинина Ю.Ю. представлены результаты, обладающие научной новизной, имеющие практическую значимость:

- выявлены факторы риска осложнений при неэффективной ЛКТ при камнях мочеточника,
- изучен патогенез гематурии и возникновения пиелонефрита у больных с МКБ,
- установлены молекулярные механизмы регуляции агрегации тромбоцитов и воспалительной реакции после КЛТ в верхнем и среднем отделах мочеточника при неэффективной ЛКТ.

В работе впервые проведен комплексный анализ механизмов патогенеза геморрагий, гематурии и пиелонефрита путем сопоставления клинико-инструментальных данных и характеристик функционального состояния Тц и лейкоцитов. Впервые доказано, что клетки крови являются репрезентативной моделью для оценки выраженности гематурии и лейкоцитурии, а также исследования механизмов регуляции гемостаза и развития пиелонефрита после КЛТ. Разработанная модель прогнозирования выраженности гематурии при неэффективной ЛКТ на этапе госпитализации позволяет обеспечить персонифицированную оценку рисков прогрессирования послеоперационной гематурии. Впервые установлено, что снижение выраженности микрогематурии после КЛТ в верхней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ и сохранении введения НПВП связано с компенсаторными реакциями Тц, которые регулируются $P2X_1$ -рецептором, AT_1 -рецептором, α_2 -адренорецептором и ФАТ-рецептором; при отмене НПВП гемостаз обеспечивается адаптационными реакциями Тц, которые регулируются $GPVI$ -рецептором, α_2 -адренорецептором и AT_1 -рецептором, PY -рецепторами.

Впервые выявлена трансформация кластера рецепторов на клетках крови, регулирующих формирование ТЛА и лейкоцитурию, которая зависит от активности ЦОГ и отдела мочеточника, на котором выполняется КЛТ.

Показано, что после КЛТ в верхней трети мочеточника и сохранении введения НПВП образование ТЛА и лейкоцитурия связаны с активностью α_2 -адренорецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора; после отмены НПВП стереотипными механизмами развития пиелонефрита являются стимуляция GPVI-рецептора и ФАТ-рецептора. В работе впервые описана функциональная активность рецепторного аппарата клеток крови у пациентов после КЛТ, выполненной в средней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ. Продемонстрирована роль ФАТ-рецептора, P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора в восстановлении гемостаза и реализации воспалительной реакции при назначении НПВП после КЛТ. Доказано, что усиление компенсаторной реакции Тц достигается благодаря синергизму P2Y-рецепторов и АТ₁-рецептора. Впервые установлены молекулярные механизмы регуляции адаптационной реакции клеток крови при восстановлении активности ЦОГ, которые определяют эффективность агрегации и исход пиелонефрита после КЛТ.

Выполненное исследование привело к созданию концепции патогенеза гематурии и пиелонефрита после малоинвазивных оперативных вмешательств на разных отделах мочеточника; позволило верифицировать механизмы регуляции компенсаторных и адаптационных реакций клеток крови при ингибировании и восстановлении активности ЦОГ, а также обеспечило понимание роли внутриклеточной сигнализации системы рецепторов, связанных с G-белками в механизмах эффективности гемостаза и развития пиелонефрита после КЛТ. На основании проведенного исследования активности рецепторов и сопряженных сигнальных путей клеток крови предложена система критериев для: диагностики и прогнозирования эффективности гемостаза и исхода пиелонефрита при нефролитиазе и после КЛТ; оценки влияния неэффективной ЛКТ на функциональную активность Тц и лейкоцитов; диагностики геморрагий, выраженности гематурии и пиелонефрита при нефролитиазе и после КЛТ; прогнозирования риска развития и прогрессирования осложнений после

оперативных вмешательств в верхней и средней трети мочеточника; определения эффективности компенсаторных и адаптационных механизмов гемостаза и ограничения развития пиелонефрита; идентификации мишеней фармакологической коррекции с целью оптимизации гемостатической и противовоспалительной терапии после малоинвазивных оперативных вмешательств на МВП.

Обоснованность и достоверность полученных результатов.

Работа основана на достаточном объёме клинического материала. Обработка информации проведена корректно, с достаточно строгим использованием математических методов обработки полученных данных с помощью статистических пакетов MedStat и MedCalc 18.10.2.

Диссертационная работа является фрагментом научно-исследовательской работы: «Моделирование ответа биологических систем (клеток, органов, организма) на действие факторов повреждения» (№ гос регистрации 0113U002251). Используемые соискателем методы диагностики соответствуют современным стандартам качества обследования больных и представлены в полном объёме. Изложенные выводы сформулированы грамотно и по существу вопроса, соответствуют цели и задачам исследования. Рекомендации представляют интерес как с теоретической точки зрения, как инструмент понимания процессов, вызывающих местную реакцию тканей при МКБ, так и с практической, как направления до-, интра- и послеоперационной коррекции осложнений, а также могут быть использованы в учебном процессе кафедр урологии и патологической физиологии.

Краткая характеристика основного содержания диссертации.

Диссертационная работа Ю.Ю. Малинина построена по классическому принципу, использовано достаточное количество литературных источников. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на съездах, конгрессах и конференциях, в достаточном количестве представлены в

научных публикациях (38 научных работ, 28 – в рецензируемых периодических изданиях). Получено 3 патента на полезные модели.

Диссертантом самостоятельно обосновано научное направление, определены цели и задачи исследования, разработаны методические подходы и избраны методы исследования. Автором самостоятельно проведен сбор материала, выполнены малоинвазивные оперативные вмешательства на мочевыводящих путях, обобщены данные клинико-инструментального обследования пациентов с нефролитиазом, проведен анализ и теоретическое обобщение результатов, сформулированы выводы. Диссертантом не были заимствованы результаты и идеи соавторов публикаций. Материалы, положения и выводы кандидатской диссертации соискателя в данной работе не использовались.

Диссертация состоит из перечня условных обозначений, введения, восьми глав, анализа и обобщения результатов исследования, выводов, практических рекомендаций и списка литературы.

Во введении обосновывается актуальность диссертационного исследования; формулируется цель и основные задачи работы; описывается предлагаемый автором подход к решению поставленных задач; характеризуется степень новизны полученных результатов и их апробация.

В первой главе автор рассматривает патогенез и методологию диагностики осложнений, механизмы регуляции гемостаза и пиелонефрита после контактной литотрипсии, влияние литокинетической терапии на гемостаз и развитие острого пиелонефрита, исследует патогенез осложнений и механизмы регуляции функциональной активности клеток крови при реализации воспаления, ремоделирования внеклеточного матрикса слизистой оболочки мочеочника – как причины гематурии.

Во второй главе изложены материал и методы исследования, грамотно обоснован дизайн исследования и клиническая характеристика пациентов, описаны методы исследования агрегационной способности тромбоцитов, методики математической обработки материала.

Исследование носило проспективный характер и включало 192 пациента с конкрементами верхней или средней трети мочеточника, которые находились на стационарном лечении в отделении РУВДДК и эндоурологии ДОКТМО с 2020 по 2022 год. Пациенты были рандомизированы в две сравнимые группы. Первая включала 118 пациентов с локализацией конкрементов в верхней трети мочеточника. У всех пациентов стандартная литокинетическая терапия (ЛКТ) оказалась неэффективна, при этом в первой группе перемещения камня из пиелoureтерального сегмента не произошло, во второй – конкремент сместился в среднюю треть мочеточника. Всем пациентам выполнена стандартная не осложненная антеградная уретеролитотрипсия. После операции в течении 2 суток сохранялась стандартная противовоспалительная терапия, включающая НПВП и антибиотики.

В третьей главе рассмотрены вопросы патогенеза гематурии после КЛТ в верхней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ. Так, в ходе исследования агрегационной способности тромбоцитов (Тц) выявлены общие закономерности их функциональной активности в разные сроки после оперативного лечения, в частности α_2 -адренорецептора, пуриновых P2X₁- и P2Y-рецепторов, аденозинового A₂-рецептора, ангиотензинового AT₁-рецептора, TxA₂-рецептора, ФАТ-рецептора и GPVI-рецептора к коллагену IV типа, что позволило выявить факторы повышения функциональной активности лейкоцитов, развития воспалительной реакции в МВП и связать их с деградацией коллагена IV типа базальной мембраны сосудов и уротелия.

В четвертой главе изучены компенсаторные и адаптационные механизмы тромбоцитарного звена гемостаза после КЛТ в верхней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ, в следствие чего выявлена связь факторов риска нефролитиаза и патогенетических факторов гематурии при хирургическом лечении, зависимости кровоточивости и приема НПВП, установлены механизмы регуляции компенсаторных и адаптационных механизмов тромбоцитарного звена гемостаза. В перспективе анализ

сенситивности рецепторов Тц позволит прогнозировать и минимизировать риски развития макрогематурии, уточнить критерии применения НПВП.

Полученные в исследовании результаты свидетельствуют об усилении адаптационных механизмов Тц, в основе которой лежит сопряженность путей сигнализации GPVI-, AT₁-, P2Y-, ФАТ- и ТхА2-рецепторов.

В пятой главе исследован патогенез развития воспалительных реакций после КЛТ в верхней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ путем измерения динамических изменений маркёров пиелонефрита (количества циркулирующих ТЛА и выраженности лейкоцитурии) на этапе госпитализации, а также через 24ч, 48ч, 72ч и 7 суток после оперативного лечения. Снижение количества ТЛА и выраженности лейкоцитурии позволяет свидетельствует об участие этих рецепторов в торможении воспалительной реакции. Установление фактов взаимодействия рецепторов на клетках крови позволяет приблизиться к установлению молекулярных механизмов патогенеза пиелонефрита в различные сроки после КЛТ и защитных реакций ограничивающих воспаление в МВП.

Определенный интерес представляет выявленная отрицательная корреляционная связь между активностью ФАТ-рецептора и А2А-рецептора, β₂-рецептора через 7 суток после КЛТ в плане поиска механизмов ограничения воспаления. Данная связь отражает ингибирующее влияние внутриклеточных сигнальных путей на синтез ФАТ в лейкоцитах. Таким образом, исследование молекулярных механизмов разных этапов воспалительной реакции в МВП после КЛТ позволит усовершенствовать профилактику и лечение пациентов с острым пиелонефритом.

В главе изучен патогенез гематурии после КЛТ в средней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ путем сопоставления активности рецепторов Тц и выраженность гематурии через 24ч, 48ч после операции при сохранении введения НПВП, и через 72ч, 7 суток после отмены НПВП.

При этом установлено, что при длительной неэффективной ЛКТ имеет место дисрегуляция моторики мочеточника, связанная с функционированием

защитных механизмов, направленных на выведение конкрементов путем повышения активности рецепторов, способных модулировать сокращение гладкомышечных клеток (ГМК). По сути, механизм, оправданный при элиминации мелких конкрементов, становится нецелесообразным применительно к выведению конкрементов средних размеров, поскольку поддерживается гипертонус мышечной оболочки. В этих условиях, низкая активность аденозинергической сигнализации, обеспечивающей релаксацию ГМК, является фактором, препятствующим трафику конкрементов, размер которых превышает диаметр просвета мочеточника. При этом внутриклеточная сигнализация, обусловленная гиперреактивностью пуриновых P2X₁- и P2Y рецепторов, α_2 -адренорецептора, AT₁-рецептора, TxA₂-рецептора, GPVI-рецептора и ФАТ-рецептора, и гипореактивностью A_{2A}-рецептора не обеспечивает элиминацию конкремента средних размеров из мочеточника, однако модулирует проагрегантную активность Тц, следствием чего является ограничение выраженности гематурии.

Таким образом, при неэффективной ЛКТ через 7 суток после КЛТ и отмены НПВП выявлено ограничение микрогематурии до легкой степени выраженности связанное с адаптационной реакцией Тц, в регуляции которой принимали участие P2Y-рецепторы, GPVI-рецептор, ФАТ-рецептор и TxA₂-рецептор. Максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии GPVI-рецептора и P2Y-рецепторов; при этом синергия может достигаться путем ко-активации фосфолипазы C β и/или ФИ-3К. Стереотипным механизмом регуляции адаптационной реакции Тц при восстановлении активности ЦОГ является сигнализация P2Y-рецепторов и TxA₂-рецептора. Вариативным механизмом, повышающими проагрегантную активность Тц, через 24ч после отмены НПВП являлась сигнализация α_2 -адренорецептора, а через 7 суток – сигнализация ФАТ-рецептора и GPVI-рецептора. Расшифровка механизмов регуляции

компенсаторных и адаптационных реакций Тц позволит разработать новые методы лечения и профилактики геморрагии связанные с КЛТ.

В 7 главе отражен патогенез пиелонефрита после КЛТ в средней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ на основании анализа функциональной активности рецепторов Тц, компенсаторных и адаптационных реакций организма, контролирующих развитие воспаления при назначении и отмене НПВП на протяжении заданных временных интервалов.

В 8 главе проведено моделирование *in vitro* механизмов регуляции компенсаторных и адаптационных реакций клеток крови после КЛТ в средней трети мочеточника. Данные исследования подтвердили, что реализация воспалительной реакции в мочевыводящих путях при сохранении введения НПВП сопровождается компенсаторным повышением формирования ТЛА и рекрутирования лейкоцитов, которое через 24ч после КЛТ в средней трети мочеточника воспроизводится при синергизме α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора; через 48ч – P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора, а также ФАТ-рецептора и АТ₁-рецептора. При отмене НПВП через 72ч после КЛТ наиболее выраженный эффект образования ТЛА воспроизводится *in vitro* при взаимодействии P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора, а также ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора. Через 7 суток количество ТЛА возрастает при взаимодействии P2X₁-рецептора и GPVI-рецептора на 23,4 % (P<0,01) и 51,9 % (P<0,001) по сравнению с изолированной стимуляцией, соответственно, GPVI-рецептора и P2X₁-рецептора.

Проведенные анализ и обобщение результатов исследования достаточно раскрывают суть проблемы возникновения и механизмов регуляции гематурии у пациентов с МКБ. В ходе исследования впервые выявлены как общие, так и специфические механизмы регуляции воспаления после КЛТ в разных отделах мочеточника. При этом участие пуринового рецептора к АТФ (P2X₁-R) и рецептора тромбоксана A₂ (TxA₂) в регуляции трафика лейкоцитов в слизистой МВП возникало независимо от отдела

мочеточника в котором проводилась КЛТ, что объяснимо, учитывая возможность сохранения воспалительной реакции до восстановления барьерной функции уротелия. При этом отмечено, что синтез ТхА2 и повышение секреции АТФ являются звеньями одной цепи патологических процессов, сохраняющихся в тканях МВП и через 7 суток после оперативного вмешательства: нарушение микроциркуляции – ишемия – воспаление – гематурия. В этом контексте стереотипные механизмы регуляции функциональной активности клеток крови и лейкоцитурия отражают наличие одних и тех факторов патогенеза пиелонефрита. Активация GPVI- и ФАТ-рецепторов объяснима с точки зрения востребованной миграции лейкоцитов при которой усиливается функциональная деградация внеклеточного матрикса МВП.

При том, что современные методы диагностики с использованием математического прогнозирования осложнений после КЛТ при экстраполяции полученных научных результатов в клиническую практику имеют низкую эффективность. При этом фундаментальные знания в области цитологии и патофизиологии не могут быть адекватно заменены расчетом корреляционных связей между показателями на большом массиве данных. Отмечено, что между фактором риска и частотой возникновения осложнения, часто выпадает теоретическое доказательство того, что исследуемый фактор действительно воспроизводит определенный механизм развития конкретного осложнения. Поэтому до этапа биостатистики, автор прибег к моделированию *in vitro* общепатологических процессов, лежащих в основе изучаемых осложнений хирургического лечения МКБ.

Одним из методических подходов к решению данной задачи стало исследование внутриклеточной сигнализации на изолированных клетках крови, имеющих известные рецепторы-«сенсоры», воспринимающие разнообразные эндо- экзогенные возмущающие воздействия. Автором *in vitro* исследованы функциональная активность рецепторов на клетках крови,

обеспечивающих «ввод информации» о патогенетических факторах нарушающих гомеостаз, пути активация клеток крови и формирование ТЛА.

Показано, что моделирование *invitro* механизмов регуляции компенсаторных и адаптационных реакций клеток крови позволяет прогнозировать эффективность гемостаза и исхода пиелонефрита после КЛТ.

Изучение молекулярных механизмов нарушений тромбогенеза и регулирования пиелонефрита после малоинвазивных оперативных вмешательств на мочеточнике, позволяют идентифицировать новые мишени фармакологической коррекции, что позволит усовершенствовать тактику литокинетической терапии. Апробация и внедрение результатов работы в урологических и нефрологических отделениях позволит повысить эффективность диагностики и прогнозирования осложнений связанных с мочекаменной болезнью и проведением литотрипсии.

Выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации обоснованы, а достоверность положений не вызывает сомнений.

Автореферат оформлен в соответствии со стандартными требованиями, материал исследования изложен доступно и понятно, содержит все основные данные, расчеты и пояснения. В диссертации проведено теоретическое обобщение и достигнуто решение актуальной научной проблемы – установить механизмы развития геморрагии, гематурии, острого пиелонефрита после уретролитотрипсии, а также восстановления гемостаза и ограничения воспалительной реакции в мочевыводящих путях при длительном и кратковременном назначении НПВП; повысить эффективность диагностики и прогнозирования гематурии и лейкоцитурии после КЛТ в разных отделах мочеточника при неэффективной ЛКТ; обосновать подходы к совершенствованию методов профилактики и лечения послеоперационных осложнений при назначении и отмене НПВП у пациентов с нефролитиазом.

Принципиальных замечаний по содержанию автореферата и диссертационного исследования нет.

К содержанию работы могут быть сделаны следующие замечания:

1. Сформулированная автором цель и поставленные задачи диссертационного исследования шире, чем заявленная тема диссертации.
2. В нескольких случаях даются не совсем четкие формулировки, что в целом не влияет на восприятие диссертационной работы.

В качестве дискуссионных вопросов хотелось бы обсудить:

1. Каковы причины, побудившие практикующего уролога провести исследование в области патологической физиологии?
2. Будет ли назначение любых ингибиторов ЦОГ приводить к увеличению количества геморрагических осложнений.
3. Каковы сроки безопасного назначения НПВП?

Указанные замечания не снижают значимости полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования Ю.Ю.Малинина.

Диссертация Малинина Юрия Юрьевича «Факторы риска, патогенез осложнений, механизмы регуляции гемостаза и пиелонефрита после контактной литотрипсии», выполненная на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького» является законченным научным трудом, который содержит решение важной научной проблемы – установить механизмы развития гематурии, лейкоцитурии после контактной литотрипсии в разных отделах мочеточника, что позволит повысить эффективность диагностики и лечения послеоперационных осложнений у пациентов с нефролитиазом. Исследование имеет существенное значение для дальнейшего развития патологической физиологии тромбогенеза, воспаления, а также регуляции функции почек и мочевыводящих путей при мочекаменной болезни.

По актуальности, обоснованности полученных результатов, теоретическому и практическому значению, научной новизне диссертационная работа Юрия Юрьевича Малинина «Факторы риска,

295007, г. Симферополь, проспект Академика Вернадского, 4, тел.: 8 (978)
971-88-28, cf_university@mail.ru