

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой оториноларингологии ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова Министерства здравоохранения Российской Федерации Овчинникова Андрея Юрьевича на диссертационную работу Мокоян Жанны Тиграновны на тему «Применение метода тканевой инженерии с использованием фактора роста фибробластов для закрытия стойких дефектов барабанной перепонки», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.3. Оториноларингология**

### **Актуальность избранной темы**

Барабанная перепонка, трансформируя звуковую волну в механическую вибрацию, играет важную роль в звукопроведении. Согласно современным представлениям, наличие стойкого дефекта барабанной перепонки требует хирургического закрытия с целью восстановления ее целостности для предотвращения развития осложнений. В результате стандартных хирургических подходов, при условии адекватной вентиляции среднего уха и васкуляризации лоскута, в большинстве случаев удаётся добиться закрытия дефекта. Однако, достигнуть полноценного восстановления колебательных характеристик барабанной перепонки при замещении дефектов используемыми соединительнотканными графтами практически невозможно. Это связано с исключительно сложным строением барабанной перепонки, не имеющей аналогов в теле человека, механические свойства которой обеспечивают амплитудно-частотные характеристики колебаний и вибраций, а следовательно, и нормальное звукопроведение. В этом плане такая новая отрасль знаний как регенеративная медицина, открывающая значительные перспективы в восстановлении тканей, не может не привлекать внимания отохирургов. Более того, наличие эндогенного прогениторного потенциала барабанной перепонки делает возможным

применение подходов тканевой инженерии без использования стволовых клеток. Тканеинженерный подход регенеративной медицины подразумевает активацию регенераторного потенциала восстанавливаемой ткани с помощью регуляторных факторов, активирующих пролиферацию и миграцию клеток. В роли регуляторных факторов выступают факторы роста, которые доставляются в ткани на специальных каркасах – скаффолдах. В ряде исследований показано эффективное закрытие дефектов при использовании фактора роста фибробластов, что безусловно вызывает научный интерес к этому направлению лечения. Остаются открытыми и являются предметом изучения учёных со всего мира множество вопросов, касающихся экспериментальной разработки методов регенеративной медицины для закрытия стойких дефектов барабанных перепонки на адекватных животных моделях, изучения процессов восстановления морфологических и механических свойств барабанных перепонки. Появление таких данных позволит эффективно внедрять подходы регенеративной медицины в клиническую оториноларингологию. Учитывая вышеуказанное, актуальность и цель диссертационного исследования Мокоян Ж.Т., посвящённого изучению потенциала применения фактора роста фибробластов в восстановлении морфологических и биомеханических характеристик барабанных перепонки в эксперименте *in vivo*, не вызывает сомнений.

**Степень обоснованности и достоверности научных положений,  
выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Достоверность и обоснованность результатов, научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, основывается на следующих положениях. При разработке темы автором тщательно проанализированы и учтены достоинства, а также недостатки опубликованных работ, касающихся регенерации барабанных перепонки.

Работа соискателя выполнена на высоком методическом уровне. Цель и задачи диссертационного исследования сформулированы корректно и полностью отражены в научной работе. Исследование выполнено на адекватной *in vivo* модели стойкой перфорации барабанной перепонки, с использованием достаточного количества экспериментального материала и размеров сформированных групп.

В исследовании решены все поставленные задачи: разработана эффективная воспроизводимая экспериментальная модель стойкой перфорации барабанной перепонки на лабораторных животных; на экспериментальной модели оценена возможность применения фактора роста фибробластов с коллагеновым скаффолдом *in vivo* при закрытии стойких перфораций барабанных перепонки, определена эффективность восстановления морфологических и механических свойств барабанных перепонки с применением тканеинженерного подхода с использованием фактора роста фибробластов.

В работе тщательно соблюдены методики исследования, для оценки результатов использован комплекс современных высокоинформативных методов, позволивших получить большой объём данных. Их статистический анализ проводился адекватными поставленным задачам способами статистической обработки и с соответствующим программным обеспечением.

Работа заканчивается пятью выводами, которые логично вытекают из задач, стоявших перед исследователем.

### **Научная новизна исследования, полученных результатов**

Научная новизна диссертации Мокоян Ж.Т. не вызывает сомнений. В исследовании на одной морфологически верифицированной экспериментальной модели стойкой перфорации барабанной перепонки изучено восстановление ткани при применении тканеинженерного подхода *in situ* – с использованием фактора роста фибробластов с коллагеновым

скаффолдом, в сравнении с применением коллагеновой губки, пропитанной физиологическим раствором, аналогично накладыванию «заплатки» после дезэпителизации краев дефекта. В рамках эксперимента *in vivo* хирургические этапы выполнялись идентичным образом на всех животных. По данным опубликованных работ, в таком варианте дизайна исследование Мокоян Ж.Т. выполнено впервые.

Автором впервые использована атомно-силовая микроскопия и наноиндентирование для изучения локальных механических свойств барабанной перепонки, восстановленной с помощью тканеинженерного подхода с использованием фактора роста фибробластов.

### **Значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Диссертация Мокоян Ж.Т. «Применение метода тканевой инженерии с использованием фактора роста фибробластов для закрытия стойких дефектов барабанной перепонки» имеет существенную научную и практическую значимость. Усовершенствованная экспериментальная модель стойкой перфорации барабанной перепонки шиншиллы является эффективной и воспроизводимой. Автором подробно описана методология формирования дефекта, а также приведены морфологические данные, подтверждающие соответствие описанной модели критериям формирования стойкой перфорации. Данная модель может использоваться в будущих исследованиях, посвящённых преclinical оценке новых методов восстановления целостности барабанных перепонки.

В исследовании экспериментально обоснована эффективность использования фактора роста фибробластов в восстановлении морфологических и механических свойств барабанной перепонки. При этом, в качестве скаффолда автор использовал коллагеновую гемостатическую губку, которая часто применяется в отохирургии.

В диссертационном исследовании с помощью целого ряда современных методов оценки, таких как морфологическое исследование при стандартной оптической микроскопии, балльная оценка морфологических признаков, фазово-контрастная и поляризационная микроскопия, атомно-силовая микроскопия и наноиндентирование, доказано, что фактор роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом способствует более быстрой и полноценной регенерации барабанной перепонки, по сравнению с использованием только коллагенового скаффолда.

Основные научные положения, материалы, методы и выводы исследования внедрены в научно-исследовательские работы кафедры болезней уха, горла и носа Института клинической медицины имени Склифосовского Первого МГМУ имени И.М.Сеченова Минздрава России и могут быть рекомендованы для использования научными коллективами при планировании экспериментальных исследований новых методов закрытия стойких перфораций барабанной перепонки. Ряд теоретических положений и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации, включены в курс лекций и практических занятий для студентов и слушателей факультета последипломного образования ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М.Сеченова (Сеченовский Университет).

### **Соответствие диссертации паспорту специальности**

Диссертация «Применение метода тканевой инженерии с использованием фактора роста фибробластов для закрытия стойких дефектов барабанной перепонки» соответствует паспорту специальности 3.1.3. Оториноларингология. Результаты научно-исследовательской работы соответствуют области исследования специальности, конкретно – пунктам 1 (исследования по изучению этиологии, патогенеза и распространения ЛОР-заболеваний) и 3 (экспериментальная и клиническая разработка методов лечения ЛОР-заболеваний и внедрение их в клиническую практику) паспорта специальности.

### **Полнота освещения результатов диссертации в печати.**

По результатам исследования автором опубликовано 4 работы, в том числе 1 статья в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК при Минобрнауки России, 3 публикации – в изданиях, рецензируемых в Scopus (в т.ч. 1 в зарубежном журнале).

Материалы диссертации неоднократно доложены и обсуждены на всероссийских, международных и иностранных конференциях.

### **Содержание и оформление диссертационной работы**

Диссертация Мокоян Ж.Т. написана грамотным литературным языком, оформлена в классическом стиле, состоит из введения, главы, посвященной обзору литературы, трех глав с подробным описанием этапов собственного исследования и обсуждения полученных результатов, заключения с оценкой перспектив внедрения описанного метода в клиническую практику, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и списка использованных сокращений. Диссертационная работа изложена на 143 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц и 30 рисунков. Указатель литературы содержит 243 наименования, из них 61 работа представлена русскоязычными источниками и 182 - иностранными.

**Во введении** автором обоснована актуальность проблемы, сформулирована цель исследования и соответствующие ей задачи. Положения, выносимые на защиту, соответствуют полученным соискателем результатам. Обозначена новизна и научно-практическая значимость, приведены данные о соответствии диссертации паспорту специальности 3.1.3. Оториноларингология, а также отмечены результаты апробации исследования и публикаций материалов работы.

**В первой главе** автором проведен подробный обзор литературы. В начале обзора представлены актуальные данные о медико-социальных аспектах стойкой тугоухости, современном состоянии проблемы лечения

пациентов со стойкими перфорациями барабанных перепонки. Далее рассматриваются современные представления о структуре барабанной перепонки в аспекте ее колебательных свойств, а также о способах оценки ее механических параметров. Невозможность полноценного восстановления морфологической структуры барабанных перепонки разработанными способами и научный прогресс определили возросший в последнее время интерес к тканевой инженерии и клеточной терапии, относящимся к регенеративной медицине. Автором подробно описывается эволюция традиционных хирургических подходов к закрытию стойких перфораций барабанной перепонки. Далее приводится анализ литературы, посвященной сравнению эффективности использования различных графтов и способов укладки трансплантатов. Автор приводит современные данные о подходах регенеративной медицины, анализирует методологию и результаты опубликованных исследований по закрытию перфораций барабанных перепонки с помощью тканеинженерного подхода, включая экспериментальные и клинические работы с использованием различных регуляторных факторов и скаффолдов (каркасов). Автором обосновываются актуальные направления для собственных исследований с использованием тканеинженерного подхода. В завершении обзора обосновывается необходимость поиска эффективной и воспроизводимой модели стойкой перфорации барабанной перепонки. В данной части обзора автор приводит основные гипотезы механизмов формирования стойкого дефекта барабанной перепонки по данным литературы.

**Вторая глава** содержит общую характеристику материалов и методов исследования. Автор обосновывает выбор лабораторного животного, описывает условия содержания животных, соответствие последних общепринятым нормам. В работе использованы 42 шиншиллы, 18 на первом этапе исследования и 24 – на втором. Для поиска эффективной модели стойкой перфорации в первой части работы проведен сравнительный анализ сформированных тремя различными способами дефектов. Затем, выбранным

способом подготовлено 36 перфораций на 24 шиншиллах для оценки эффективности тканеинженерного способа закрытия стойких дефектов в рамках второго этапа работы. Автор иллюстрирует главу наглядными дизайн-схемами этапов собственного исследования.

В главе детально описаны методы оценки полученных результатов, включая различия в методологии исследований на первом и втором этапах работы, а также использованные методы статистического анализа. Автором подробно описана техника проведения отоэндоскопии у шиншилл, с помощью которой осуществлялось динамическое наблюдение с оценкой состоятельности дефектов. Кроме стандартной световой микроскопии во второй части исследования используются фазово-контрастная и поляризационная микроскопия, а также морфометрический анализ в виде балльной оценки шести морфологических признаков. Далее, автор раскрывает суть метода атомно-силовой микроскопии и наноиндентирования с вычислением модуля Юнга (модуля упругости), характеризующего эластичность ткани.

**Третья и четвертая главы** посвящены подробному описанию первого и второго этапов собственного экспериментального исследования, соответственно. **Третья глава** содержит результаты поиска эффективной модели стойкой перфорации. Автор демонстрирует значимые различия в сроках персистирования дефектов между группами исследования: в группе холодной мириготомии с подворачиванием краев перфорации - 2,5 недели, в группе лазерной мириготомии – 5 недель, в группе холодной мириготомии с подворачиванием краев перфорации и временной установкой тимпаностомической трубки - 8 недель. При проведении микроскопического исследования поперечных срезов перепонки, содержащих край сформированных стойких перфораций из третьей группы, обнаружено утолщение края перфорации за счет подворачивания наружного эпителиального слоя барабанной перепонки.



**Четвертая глава** посвящена подробному описанию хода второго этапа собственного исследования, включающего оценку эффективности тканеинженерного подхода с использованием фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом. Полученные посредством холодной мириготомии с временной установкой тимпаностомической трубки 36 стойких дефектов были распределены в три равные группы: в первой и второй группах производилось закрытие дефектов с использованием коллагенового скаффолда с фактором роста фибробластов и без него, соответственно, а в третьей группе продолжалось наблюдение за сформированными дефектами без вмешательств. Наличие третьей группы позволило авторам увеличить сроки динамического наблюдения за выбранной моделью стойкой перфорации для исключения спонтанного закрытия в отдаленном периоде. По окончании периода наблюдения, составляющего 12 недель с момента полного закрытия перфораций, животные выводились из эксперимента для оценки морфологических и локальных механических свойств восстановленной барабанной перепонки.

**Пятая глава** содержит результаты второго этапа исследования. В главе выделяется три подраздела, посвященных анализу сроков закрытия перфораций, оценке морфологических и механических свойств восстановленных барабанных перепонок. Глава сопровождается большим количеством таблиц и наглядного иллюстративного материала. Автор отмечает, что в первой и второй группах значимо отличались сроки, необходимые для достижения полного закрытия перфорации. Так, средний срок закрытия перфораций в I группе составил  $2,67 \pm 0,39$  недель, а во II группе -  $10,50 \pm 1,11$  недель ( $p < 0,05$ ). Случаев спонтанного закрытия перфораций в третьей группе без вмешательств отмечено не было. Далее автором продемонстрированы результаты, достоверно показывающие различия в ткани восстановленных барабанных перепонок между группами. Так, при закрытии дефекта коллагеновым скаффолдом, пропитанным физиологическим раствором, отмечено отсутствие трехслойной структуры,

рыхлая упаковка волокон в фиброзном слое практически на всем протяжении, хаотичная архитектура ультраструктуры коллагеновых волокон, а при использовании фактора роста фибробластов дефект замещался тканью, с чётким разделением эпителиальных и соединительнотканного слоя, плотной упаковкой коллагеновых фибрилл в волокнах фиброзного слоя, значительно приближающейся по своей структуре к интактной барабанной перепонке. Балльная оценка 6 морфологических признаков выявила статистически значимые различия между перепонками, восстановленными с использованием фактора роста фибробластов и коллагенового скаффолда, и регенератами, восстановленными без фактора роста фибробластов, по 4-м из них ( $p < 0,1$ ).

Использование высокоинформативного метода атомно-силовой микроскопии позволило соискателю оценить результаты восстановления барабанных перепонки в микронных масштабах, было показано, что ультраструктура фиброзного слоя после применения тканеинженерного подхода с использованием фактора роста фибробластов в значительной степени приближается к морфологической структуре и эластичности интактных перепонки. Модуль Юнга фиброзного слоя регенератов, восстановленных с использованием фактора роста фибробластов, по данным атомно-силовой микроскопии не имел значимых отличий от значений интактных барабанных перепонки ( $p = 0,07$ ).

**В заключении** автором проводится анализ полученных результатов исследования, их обобщение и сравнение с данными литературы. По совокупности проведенных экспериментов автор делает заключение, что применение рекомбинантного фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом для закрытия стойких перфораций барабанной перепонки в экспериментальных условиях оказалось эффективным и безопасным. Далее автор отмечает возможные перспективы применения описанного метода в клинической практике. Данный раздел представляется актуальным и важным ввиду особенностей нормативно-правовых актов,

регулирующих применение технологий регенеративной медицины в нашей стране.

Данные, полученные в работе, позволили соискателю сформулировать выводы и практические рекомендации, основанные на результатах собственных исследований.

#### **Соответствие автореферата содержанию диссертации.**

Автореферат составлен по общепринятой форме и полностью отражает основные положения диссертации.

#### **Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации**

Работа Мокоян Ж.Т. содержит новое решение научной задачи по закрытию стойкой перфорации барабанной перепонки с помощью тканеинженерной технологии в условиях эксперимента.

Встречаются единичные опечатки и погрешности в оформлении диссертации, не ухудшающие общее впечатление. Указанные замечания не носят принципиального характера и не снижают общего положительного впечатления от рецензируемой работы. На отдельные неточности и погрешности в изложении текста указано автору в устной беседе. Принципиальных замечаний к работе нет.

#### **Заключение**

Диссертация Мокоян Жанны Тиграновны на соискание ученой степени кандидата медицинских наук на тему «Применение метода тканевой инженерии с использованием фактора роста фибробластов для закрытия стойких перфораций барабанной перепонки», выполненная под руководством д.м.н., профессора Свистушкина В.М. и при научном консультировании д.х.н, доцента Тимашева П.С., является научно-квалификационной работой, которая содержит решение актуальной научной задачи – преклинической оценки потенциала фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом в восстановлении морфологических и биомеханических свойств барабанной перепонки, имеющей существенное значение для специальности 3.1.3. Оториноларингология, что соответствует требованиям п. 16 Положения

присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом ректора от 06.06.2022 г. № 0692/Р, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Мокоян Жанна Тиграновна заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности – 3.1.3. Оториноларингология.

2 ноября 2022 года

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой оториноларингологии  
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
доктор медицинских наук (14.01.03 – Болезни уха, горла и носа),  
профессор

  
Овчинников Андрей Юрьевич

Подпись официального оппонента, д.м.н., профессора Овчинникова А.Ю.  
«заверяю»

Ученый секретарь

ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова  
Минздрава России,  
доктор медицинских наук,  
профессор

  
Васюк Юрий Александрович

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России)

Адрес: 127473, г. Москва, ул. Делегатская, д.20, стр.1; E-mail: [msmsu@msmsu.ru](mailto:msmsu@msmsu.ru)  
Тел.: +7 (495) 609-67-00; Адрес сайта: <https://www.msmsu.ru>