

Отзыв

Официального оппонента доктора медицинских наук, заведующего отделением реконструктивной хирургии полых органов шеи ГБУЗ «Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского» Департамента здравоохранения города Москвы Кирасировой Елены Анатольевны на диссертационную работу Свистушкина Михаила Валерьевича «Экспериментальное обоснование применения мезенхимальных стромальных клеток в лечении рубцовых повреждений голосового отдела гортани », представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.03 – болезни уха, горла и носа.

Наименование организации: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского» Департамента здравоохранения города Москвы

Адрес сайта: www.nikio.ru

Должность: заведующий отделением реконструктивной хирургии полых органов шеи

Ученая степень: доктор медицинских наук

Почтовый адрес: 117152, Москва, Загородное шоссе, д. 18А, стр. 2

Телефон: 89163074465 **Электронная почта:** 43lor@mail.ru

Актуальность исследования.

Актуальность проблемы лечения больных с рубцовыми повреждениями голосового отдела гортани обусловлена как широким распространением данной патологии, так и сложностью ее лечения, обусловленной склонностью структур голосового отдела гортани к рубцеванию, что влечет нарушение структуры и функции голосовой складки. Отсутствие единого алгоритма лечения больных с рубцовыми повреждениями голосового аппарата гортани обусловлено особенностью течения рубцового процесса в каждом конкретном случае и полиэтиологичностью заболевания: различные травмы, включая хирургическую травму, заболевания (доброкачественные и злокачественные), аутоиммунные процессы, профессиональные, социальные, экологические и генетические факторы являются пусковым звеном заболевания.

Особенностью лечения рубцовых процессов является то, что существующие методы лечения улучшают дыхательную функцию, но не восстанавливают структуру собственной пластинки слизистой оболочки голосовой складки, которая обеспечивает ее биомеханические свойства.

Технологии регенеративной медицины должны помочь в реализации данной проблемы за счет целенаправленной контролируемой активации прогениторных клеток, нормализации синтеза компонентов межклеточного матрикса и ограничения интенсивности воспалительного процесса.

Изучению механизмов регенерации голосовых складок в доклиническом эксперименте посвящена данная работа, актуальность выбранной диссертантом темы не вызывает сомнения и имеет существенное значение для здравоохранения.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению диссертации.

Целью диссертационной работы Свистушкина Михаила Валерьевича явилось

изучение потенциала мезенхимальных стромальных клеток в восстановлении морфологических и биомеханических характеристик голосовых складок в эксперименте *in vivo* при рубцовых повреждениях.

Автором определены задачи исследования, позволившие раскрыть суть работы: 1) усовершенствование экспериментальной модели рубцового процесса голосовых складок изучить на лабораторных животных для обеспечения ее воспроизводимости при восстановлении структуры голосового отдела гортани методами регенеративной медицины; 2) оценить возможность применения клеточных продуктов на основе мезенхимных стромальных клеток (МСК) костного мозга человека и клеточного носителя – полиэтиленгликоль (ПЭГ) фибринового геля *in vivo* при восстановлении рубцовых повреждений голосовых складок на экспериментальной модели; 3) оценить эффективность восстановления морфологических свойств голосового отдела гортани с использованием МСК костного мозга: аутологичных - в суспензии, человеческих – в суспензии и в комплексе с ПЭГ фибриновым гелем – на экспериментальной модели рубцового процесса голосовых складок;

4) оценить эффективность восстановления локальных биомеханических свойств голосового отдела гортани с использованием МСК костного мозга: аутологичных - в суспензии, человеческих – в суспензии и в комплексе с ПЭГ фибриновым гелем – на экспериментальной модели рубцового процесса голосовых складок.

Поставленные задачи вытекают из цели исследования и отражают основные направления диссертационной работы.

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.

Тема диссертации Свистушкина М.В., её научные положения, результаты и выводы соответствуют специальности 14.01.03 – Болезни уха, горла и носа. При разработке темы автором тщательно проанализированы и учтены достоинства, а также недостатки опубликованных работ, касающихся регенерации голосовых складок.

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 рубцовых повреждений голосовых складок, с использованием достаточного количества экспериментального материала и размеров сформированных групп.

В исследовании решены все поставленные задачи: усовершенствована экспериментальная модель рубцового процесса голосовых складок на лабораторных животных; на экспериментальной модели оценена возможность применения клеточных продуктов на основе мезенхимных стромальных клеток (МСК) костного мозга человека и клеточного носителя – полиэтиленгликоль (ПЭГ)-фибринового геля *in vivo* при восстановлении рубцовых повреждений голосовых складок, определена эффективность восстановления морфологических и биомеханических свойств голосовых складок с использованием аутологичных и человеческих МСК костного мозга

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.

По результатам исследования автором опубликовано 12 работ, в том числе 5 статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты

диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук (из них 3 статьи в научных изданиях, индексируемых Scopus). Материалы диссертации неоднократно доложены и обсуждены на всероссийских, международных и иностранных конференциях.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Научная новизна диссертации Свистушкина М.В. не вызывает сомнений. В исследовании на одной экспериментальной модели рубцовых повреждений голосовых складок изучены как аутологичные, так и ксеногенные (человеческие) клетки из одного источника (костный мозг), хирургические этапы выполнялись идентичным образом на всех животных. Это отражает основную стратегию доклинических испытаний с использованием клеточной терапии: в доклинических исследованиях должны использоваться клетки, планируемые к применению в клинической практике, несмотря на возможные иммунологические конфликты. Таким образом, в работе соискателя рассмотрены оба варианта клеточных продуктов: 1) аутологичные клетки, исключающие несовместимость; 2) ксеногенные клетки, потенциально применимые в клинике. По данным опубликованных работ, в таком варианте дизайна - исследование Свистушкина М.В. выполнено впервые. В рамках работы автором впервые была оценена возможность использования комплекса мезенхимных стромальных клеток (МСК) костного мозга человека и нового клеточного носителя – ПЭГ-фибринового геля *in vivo* при восстановлении рубцовых повреждений голосовых складок. На экспериментальной модели доказан его гемостатический эффект и положительное влияние на сохранение клеток, имплантированных в рану голосовых складок. Впервые была проведена углубленная оценка восстановления морфологических и вязкоупругих характеристик повреждений голосовых складок под влиянием имплантированных МСК костного мозга в эксперименте *in vivo*, особое

внимание уделено репарации коллагеновых волокон и восстановлению локальных биомеханических свойств собственной пластинки.

Научно-практическая значимость полученных автором результатов

Диссертация М.В. Свистушкина «Экспериментальное обоснование применения мезенхимных стромальных клеток в лечении рубцовых повреждений голосового отдела гортани» имеет существенную научную и практическую значимость. Усовершенствованная экспериментальная модель рубцового процесса голосового отдела гортани лабораторных кроликов является воспроизводимой. Разработанные параметры наносимого дефекта голосовой складки через 3 месяца приводят к формированию хорошо заметного рубца. Данная модель может использоваться в дальнейших экспериментальных разработках методов лечения рубцов голосовых складок.

В исследовании экспериментально обоснована возможность использования клеточного носителя – ПЭГ-фибринового геля. В ларингологии препараты фибрина в качестве биологического клея и гемостатического средства широкого применяются в клинической практике, отмечается их перспективность в качестве среды для доставки лекарств. По данным литературы, *in vitro* модификация фибрина с полиэтиленгликолем благоприятно влияет на ангиогенез, распространение, рост и пролиферацию МСК, в то же время в эксперименте *in vivo* на голосовых складках в диссертационной работе соискателя ПЭГ-фибриновый гель в качестве скаффолда применен впервые. В данном исследовании показано, что в первую неделю данный имплантат не вызывает воспалительной реакции и сохраняет свою целостную структуру, практически не подвергаясь биодеградации. При проведении имплантационных операций в голосовые складки в экспериментальных группах, где использовался ПЭГ-фибриновый гель, по сравнению с солевым буферным раствором выявлена статистически значимая

меньшая интенсивность кровотечения во время операции, при этом время вмешательства практически не имело различий между группами, несмотря на подготовку двухкомпонентного препарата при использовании фибринового скаффолда, также не выявлено различий в показателях дыхательных нарушений. По данным литературы, оценка кровотечения и дыхания в экспериментальных исследованиях по восстановлению голосовых складок методами регенеративной медицины ранее не проводилась, несмотря на возможность потери клеток из места имплантации при кровотечении и непредсказуемость риска развития реактивного отёка и миграции имплантатов при исследовании новых биоматериалов. В исследовании показано, что введение МСК костного мозга человека, иммобилизованных в ПЭГ-фибриновом гидрогеле, обеспечивало более высокую концентрацию МСК в месте повреждения на 3-й день, что также имеет существенное значение в виду наибольшей активности репарационных процессов на ранних сроках.

В диссертации Свистушкина М.В. с помощью целого ряда современных методов оценки: морфологического исследования с различными видами окрасок и режимов световой микроскопии, морфометрического анализа толщины рубцовой ткани, балльной оценки морфологических признаков рубцовой ткани, иммуногистохимического исследования коллагенов I и III типов, атомно-силовой микроскопии, наноиндентирования было доказано, что МСК костного мозга, введенные в рану голосовой складки сразу после иссечения зрелого рубца, способствуют заживлению слизистой оболочки. В замещенной ткани, формирующейся на фоне имплантированных МСК рубцовые процессы выражены слабее и морфологически она стоит ближе к нативной структуре голосовой складки по сравнению с дефектами, репарация которых проходила без введения клеток. Статистически значимо ($p < 0,05$) уменьшается толщина рубца, его площадь, снижается плотность упаковки коллагеновых структур, происходит восстановление их архитектоники и количественного баланса коллагена III и I типов. Восстановление морфологии

голосовых складок подтверждается восстановлением механических характеристик: в рубцах голосовых складок после имплантации МСК модуль Юнга по данным автора был статистически значимо меньше ($p < 0,05$), чем в рубцах без имплантации, что говорит о формировании более эластичной ткани.

Полученные результаты достоверно и наглядно показывают механизмы и репарационные особенности восстановления рубцов голосовых складок при имплантации МСК костного мозга, данные, полученные в исследовании, определяют конкретные пути реализации результатов при их последующей трансляции в клиническую практику, что позволит повысить эффективность лечения пациентов с рубцовыми повреждениями голосового отдела гортани.

Материалы и методы исследования, его основные научные положения и выводы используются в научно-исследовательских работах и учебном процессе кафедры болезней уха, горла и носа и Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ России (Сеченовский университет) и могут быть рекомендованы к использованию научными коллективами, занимающимися проблемой рубцовых повреждений гортани.

Структура, содержание и оформление диссертационной работы

Диссертационная работа представлена на 196 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц и 56 рисунков. Список литературы включает 237 источников, из них 28 отечественных и 209 зарубежных.

Диссертация оформлена в классическом стиле, состоит из введения, главы, посвященной обзору литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, 3-х глав с результатами собственных исследований, обсуждения, заключения, раздела с анализом перспектив трансляции результатов в клиническую практику, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и списка использованных сокращений.

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 14.01.03 «Болезни уха, горла и носа», результаты апробации исследования и публикаций материалов работы.

В первой главе автором проведен подробный обзор литературы, в котором анализируется степень разработанности проблемы. В начале обзора представлены современные данные о строении голосовых складок и его связи с биомеханическими вибрационными свойствами. Далее рассматривается проблема рубцовых повреждений голосового отдела гортани, которая освещена с позиции этиологии, патогенеза, классификации, диагностических подходов и используемых в настоящее время методов лечения. Невозможность полноценного восстановления морфологической структуры голосовых складок, разработанными способами и научный прогресс определили возросший в последнее время интерес к клеточным технологиям, относящимся к регенеративной медицине. Автором приводятся данные о методах регенеративной медицины, источниках клеток, анализируются методология и результаты опубликованных исследований по регенерации повреждённых голосовых складок с помощью клеточной терапии. В завершении обзора обосновываются актуальные направления для собственных исследований с использованием мезенхимных стромальных клеток костного мозга.

Во второй главе описываются материалы и методы, использованные в исследовании. В работе использованы 48 лабораторных кроликов, которым создавался односторонний дефект голосовой складки, через 3 месяца рубец иссекался и во вторичную рану производилась имплантация клеточного продукта. До имплантации клеток автором проведено усовершенствование экспериментальной модели рубцового процесса голосовых складок,

заключившееся в определении параметров наносимого дефекта голосовой складки, позволяющего через 3 месяца получить визуально определяемый рубец.

Соискателем выполнены две серии экспериментов: с использованием аутологичных и человеческих МСК. В работе с аутологичными МСК животные разделялись на 2 экспериментальные группы: контрольная – во вторичную рану вводился физиологический раствор и основная – имплантировалась суспензия предварительно полученных и накопленных МСК костного мозга каждого животного. В эксперименте с МСК человека МСК имплантировались в суспензии солевого раствора и в ПЭГ-фибриновом геле, экспериментальных групп было 4, их условные обозначения: 1) МСК в суспензии, 2) МСК в геле; 3) гель без клеток; 4) контроль (рубцы без имплантации клеток). В каждой группе было по 6 животных. Дополнительно по 3 животных были использованы в группах 1 и 3, им вводились клетки, трансдуцированные вирусным вектором, экспрессирующим GFP (зелёный флюорисцирующий белок), что делало возможным их идентификацию в тканях. Для оценки тканевой реакции и степени биодegradации ПЭГ-фибринового геля был подкожно имплантирован 8 лабораторным крысам породы Вистар.

В главе подробно описаны методы создания дефекта голосовых складок и имплантации клеточных продуктов, клеточные методы, использовавшиеся в экспериментах, приведены соответствующие фотографии, таблицы и схемы.

Далее во 2-й главе следует описание методов оценки результатов исследования и их статистического анализа. Оценка интраоперационного кровотечения и выраженности дыхательных нарушений проводилась в работе с МСК человека: непосредственно после имплантации клеточного продукта оценивалась интенсивность кровотечения с помощью 4-х балльной шкалы, интенсивность, длительность стридора и частота дыхательных движений.

Исследование восстановления структуры голосовых складок в работе диссертанта проводилось через 3 месяца после рубцевания повторной раны.

Для этого применялось морфологическое исследование препаратов голосовых складок. Кроме стандартной световой микроскопии проводилась фазово-контрастная и поляризационная микроскопии, морфометрический анализ в виде балльной оценки 11 морфологических признаков, исследование толщины рубцов, иммуногистохимический анализ коллагена I и III типов. В работе с аутологичными МСК механические свойства (модуль Юнга) и ультраструктура собственной пластинки голосовых складок исследовались с помощью атомно-силовой микроскопии. После имплантации МСК человека вязко-упругие характеристики голосовых складок определялись методом наноиндентирования, дополнительно проведен ряд измерений вибрационных характеристик макропрепаратов.

Третья, четвертая и пятая главы посвящены описанию результатов собственных исследований. В третьей главе приведены результаты усовершенствования экспериментальной модели: резекция слизистой оболочки голосовой складки до голосовой мышцы на протяжении 1/3 голосовой складки с отступом 3 мм от передней комиссуры приводила к формированию рубца, через 3 месяца хорошо идентифицируемого при осмотре, дефекты меньшего размера не приводили к формированию визуально заметной рубцовой ткани, различия были статистически значимы ($p < 0,05$).

По данным морфологического исследования, при подкожном введении – имплантат ПЭГ-фибринового геля через 3 и 7 дней был обнаружен в месте имплантации, до 7-х суток имплантат практически не подвергается биодеградации, а также воспалительной реакции на имплантацию. Это послужило обоснованием для использования ПЭГ-фибринового геля в качестве клеточного носителя при имплантации МСК в голосовые складки.

Свистушкиным М.В. установлено, что в группах, где использовался ПЭГ-фибриновый гель, выявлена меньшая интенсивность кровотечения при имплантации в голосовые складки ($p < 0,05$). Также по данным исследования интенсивности, длительности стридорозного дыхания, ЧДД не получено

значимых различий между группами, что свидетельствует об отсутствии более высокого риска нарушений дыхания по сравнению с инъекцией эквивалентного объема физиологического раствора.

С помощью конфокальной микроскопии препаратов голосовых складок с имплантированными трансдуцированными клетками в суспензии и ПЭГ-фбриновом геле выявлено, что введение МСК, иммобилизованных в ПЭГ-фбриновом гидрогеле, обеспечивало более высокую концентрацию клеток в месте повреждения на 3-й день. Данные результаты интерпретируются автором с двух позиций: ПЭГ-фбриновый гель способствует выживанию и миграции клеток благодаря благоприятному микроокружению, что коррелирует с данными *in vitro* исследований; МСК сохраняются в месте имплантации за счёт уменьшения их потери при кровотечении во время операции, благодаря гемостатическому эффекту фбринового скаффолда.

В четвертой главе автором продемонстрированы результаты достоверно показывающие различия в рубцовой ткани голосовых складок, формируемой под влиянием аутологичных МСК костного мозга. Плотные, обширные рубцы с хаотичной архитектоникой коллагеновых волокон контрольной группы, репарация дефектов в которой происходила вне влияния МСК, в опытной группе имплантации клеток замещались тканью, с продольным, параллельным расположением коллагена, значительно приближающейся по своей структуре к интактным голосовым складкам. Балльная оценка 11 морфологических признаков выявила статистически значимые различия между рубцами после имплантации аутологичных МСК и рубцами без имплантации по 4-м из них, альтерация преобладала в группе рубцов без имплантации ($p < 0,1$). Наблюдалась заметная тенденция к уменьшению толщины рубца от группы рубцов без имплантации (344,6 мкм, $\sigma = 62,5$ мкм) к группе после имплантации МСК (259,5 мкм, $\sigma = 32,4$ мкм), $p = 0,0613$. Имуногистохимическое исследование выявило восстановление соотношения коллагена I и III типов в основной группе, по сравнению с рубцами без имплантации МСК ($p < 0,05$).

Модуль Юнга рубцовой ткани голосовых складок, образованной под влиянием МСК по данным атомно-силовой микроскопии не имел значимых отличий от значений интактных голосовых складок ($p=0,59$).

В 5-й главе приведены результаты экспериментов с МСК костного мозга человека. Морфологическое исследование через 3 месяца после имплантации показало, что в группе, где использовался комплекс ПЭГ-фибринового гидрогеля с МСК костного мозга человека, отмечалось более выраженное уменьшение общей площади и толщины рубцовой ткани на месте послеоперационного дефекта по сравнению с группами, где были использованы МСК костного мозга человека в суспензии, ПЭГ-фибриновый гель без клеток, либо имплантации не проводилось. Исследование толщины рубцово-измененной собственной пластинки выявило её меньшую толщину у всех трёх опытных групп по сравнению с группой рубцов без имплантации, наибольшие различия были обнаружены с опытной группой комбинированной имплантации (МСК+ПЭГ-фибриновый гель); ($p<0,0001$). Исследование вибрационной динамики выявило уверенное повышение вибрационных частот голосовых складок с рубцами без имплантации по сравнению с интактными, в то же время каких-либо корреляций в характеристиках определяемых вибро-частот между голосовыми складками после имплантации комплекса МСК и ПЭГ-фибринового геля и интактными обнаружено не было. Измерение локальных механических характеристик (модуль Юнга) голосовых складок показало, что между группой применения МСК человека в ПЭГ-фибриновом геле и интактными голосовыми складками отсутствовали значимые различия, (1.17 ± 0.45 кПа и 1.15 ± 0.25 кПа соответственно) а с остальными группами параметры были статистически значимо ниже ($p < 0,05$).

В обсуждении и заключении автором проводится анализ полученных результатов исследования, их обобщение и сравнение с данными литературы. По совокупности проведенных экспериментов автор делает заключение, что МСК костного мозга, при имплантации в острую фазу раны голосовой складки

после иссечения рубца обладают свойствами увеличивать степень их регенерации, ПЭГ-фибриновый гель является оптимальным скаффолдом для имплантации МСК в голосовые складки) Данные, полученные в работе позволили соискателю сформулировать выводы и практические рекомендации, основанные на результатах собственных исследований.

Диссертационная работа Свистушкина М.В. хорошо оформлена, написана грамотно и в достаточной степени иллюстрирована, можно отметить незначительное количество опечаток и стилистических ошибок, не снижающих её качество. Принципиальных замечаний к работе нет.

Автореферат отражает основное содержание проведенного автором исследования, отвечает требованиям, предъявляемым к работам на соискание учёной степени кандидата медицинских наук.

В порядке дискуссии хотелось бы задать автору следующие вопросы :

- 1) когда, по мнению автора, возможно клиническое применение разработанного им метода регенеративной медицины?
- 2) Возможно ли одновременное использование мезенхимальных клеток в различных отделах гортани и трахеи?

Заключение


Диссертационная работа Свистушкина Михаила Валерьевича на тему «Экспериментальное обоснование применения мезенхимных стромальных клеток в лечении рубцовых повреждений голосового отдела гортани», на соискание учёной степени кандидата медицинских наук, является завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научной задачи – экспериментального обоснования возможностей мезенхимных стромальных клеток костного мозга в восстановлении морфологических и биомеханических характеристик голосовых складок при рубцовых повреждениях голосового отдела гортани, что имеет существенное значение для специальности 14.01.03. – болезни уха горла и носа.

Диссертация по своей актуальности, новизне, научной и практической значимости соответствует требованиям п. 16 Положения о 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 №0094/Р от 31.01.2020 года, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Свистушкин Михаил Валерьевич заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности **14.01.03 –** Болезни уха, горла и носа.

Доктор медицинских наук
(14.01.03 – Болезни уха, горла и носа)
Заведующий научно-исследовательским
отделом реконструктивной хирургии
полых органов шеи
ГБУЗ «НИКИО имени
Л.И. Свержевского» ДЗМ



Кирасирова Елена Анатольевна

подпись Е.А. Кирасировой
заверяю "30" ноября 2021 г.
начальник отдела кадров
 И.С. Калинина

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского» Департамента здравоохранения города Москвы
(ГБУЗ «НИКИО имени Л.И. Свержевского» ДЗМ)
Адрес: 117152, Москва, Загородное шоссе, д. 18А, стр. 2; E-mail: nikio@zdrav.mos.ru; тел. 8 (495) 633-92-36; web сайт <https://nikio.ru/>