

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора кафедры оториноларингологии ФДПО ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, руководителя научно-клинического отдела патологии уха и основания черепа ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр оториноларингологии» ФМБА России Диаб Хассан Мохамад Али 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

Наличие стойкого дефекта барабанной перепонки значительно ухудшает качество жизни пациентов и является абсолютным показанием к хирургическому лечению, целью которого является восстановление целостности перепонки для предотвращения осложнений и возвращения функции звукопроводения. Пластическое закрытие перфорации барабанной перепонки заключается в формировании так называемого тимпаномеатального лоскута, основу которого составляет соединительнотканый графт. Приживление лоскута зависит от ряда факторов, включая состояние слуховой трубы и эффективность микроциркуляции. По данным различных авторов, частота реперфораций после хирургического лечения достигает 25%. Также стоит отметить, что даже при удовлетворительной васкуляризации лоскута и полном приживлении графта, функциональный результат не всегда предсказуем ввиду замещения дефекта тканью, отличающейся по своим свойствам от нативной барабанной перепонки. Соответственно, несмотря на совершенствование инструментария и разнообразие описанных методик

традиционной мирингопластики, поиск возможных высокоэффективных альтернативных способов закрытия перфораций барабанной перепонки остается весьма актуальной проблемой, требующей проведения комплексных преклинических исследований новых подходов.

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

Следует отметить высокий методический уровень исследования. Набор используемых методов обширен, систематизирован и соответствует поставленной цели и задачам исследования. В диссертации Мокоян Ж.Т. на основе серии экспериментов последовательно обосновывается концепция возможности применения фактора роста фибробластов на коллагеновом скаффолде для закрытия перфораций барабанной перепонки. Произведен поиск эффективной и воспроизводимой экспериментальной модели на лабораторных животных; выполнены операции по закрытию стойкой перфорации барабанной перепонки; оценены сроки закрытия дефектов; подробно изучены результаты восстановления морфологических и биомеханических свойств барабанных перепонки. Большой объем проанализированного материала позволил автору адекватно сформулировать выводы и положения, выносимые на защиту. Практические рекомендации основаны на полученных результатах исследования. Обоснованность научных положений, выводов, рекомендаций, представленных в диссертации, базируется на достаточном объеме материала, подтверждается комплексным анализом полученных результатов и их статистической обработкой, апробацией основных результатов на научных конференциях и семинарах, в научных публикациях.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

Достоверность результатов работы основана на соответствии дизайна исследования поставленным цели и задачам, достаточном объеме материала

исследования и размеров экспериментальных групп, тщательном соблюдении методик исследования, применении комплекса современных методов оценки результатов и адекватных методов их статистической обработки.

Диссертация Мокоян Ж.Т. является первым исследованием в России, в котором проводится экспериментальное обоснование применения фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновой гемостатической губкой для закрытия стойких перфораций барабанной перепонки.

В рамках работы автором впервые использована атомно-силовая микроскопия и наноиндентирование для изучения локальных механических свойств барабанной перепонки, восстановленной тканеинженерным подходом. В данном исследовании впервые проведено комплексное обоснование эффективности полноценной регенерации барабанной перепонки при тканеинженерном подходе с использованием фактора роста фибробластов и коллагенового скаффолда.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

В рамках диссертационного исследования Мокоян Ж.Т. разработана эффективная воспроизводимая модель стойкой перфорации барабанной перепонки на малых лабораторных животных. Автором продемонстрировано, что выполнение холодной мириготомии с последующей временной установкой тимпаностомической трубки достоверно позволяет получить дефект, персистирующий более 8 недель. Эффективность модели доказана морфологической верификацией формирования стойкой перфорации, при этом гистологическое исследование краев перфораций выполнялось спустя 10 недель пер дефекта, что соответствует срокам хронической перфорации барабанной перепонки по данным литературы. С этих позиций описанная модель стойкого дефекта является эффективной и может быть использована

для дальнейших экспериментальных разработок новых подходов к закрытию стойких перфораций барабанной перепонки.

Большая научно-практическая ценность работы заключается в комплексной оценке свойств восстановленных барабанных перепонки при использовании коллагенового скаффолда, пропитанного фактором роста фибробластов или физиологическим раствором. В частности, автором выполнено гистологическое исследование восстановленных фрагментов перепонки с использованием различных режимов оптической микроскопии, позволяющих оценить выраженность участков разрыхления в соединительнотканном слое перепонки. Восстановление трехслойной структуры барабанной перепонки отмечено лишь при использовании фактора роста фибробластов на коллагеновом носителе. С помощью атомно-силовой микроскопии проведена сравнительная оценка топографии и ультраструктуры коллагеновых волокон в фиброзном слое нативных и восстановленных барабанных перепонки. Более того, выполнено наноиндентирование фиброзного слоя нормальных и восстановленных перепонки из обеих групп лечения, что позволило вычислить медианный модуль упругости, определяющий локальные механические свойства ткани. Автором показано, что медианные значения модулей упругости фиброзного слоя нативных барабанных перепонки и перепонки, восстановленных с использованием фактора роста фибробластов были сопоставимы. В то время как показатели для перепонки, восстановленных без использования фактора роста фибробластов, статистически значимо отличались от значений в референсной группе.

Основные научные положения, материалы, методы и выводы исследования могут быть рекомендованы для использования научными коллективами при планировании экспериментальных исследований новых методов закрытия стойких перфораций барабанной перепонки.

Важным итогом диссертационной работы Мокоян Ж.Т. является

доказательство эффективности закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки с помощью коллагенового скаффолда, пропитанного фактором роста фибробластов в условиях эксперимента. Данный метод в будущем может стать альтернативой хирургическому закрытию дефектов тимпанальной мембраны.

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.

Материалы диссертации полноценно освещены в 4 печатных работах, опубликованных в рецензируемых журналах, в том числе 1 статья в журнале, включенном в Перечень ВАК при Минобрнауки России, 3 статьи - в Scopus, из них 1 публикация - в зарубежном высокорейтинговом журнале, что свидетельствует о высоком научно-методическом уровне полученных результатов.

Содержание и оформление диссертационной работы

Диссертация представлена на 143 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием дизайна и методов исследования, использованных в работе, двух глав собственных исследований, главы, посвященной обсуждению полученных результатов,

заклучения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Текст документирован 11 таблицами и 30 рисунками. Указатель литературы содержит 243 источника, из них 61 отечественных и 182 зарубежных.

Во введении автором подробно обоснована актуальность исследования, сформулирована цель, задачи исследования и основные положения, выносимые на защиту, представлена методология исследования, обозначены научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов. Также во введении приведено внедрение результатов исследования, обозначено соответствие диссертации паспорту специальности, освещен личный вклад автора в проведение исследования и апробация диссертации на научно-практических мероприятиях.

Первая глава разделена на несколько подразделов, в которых содержится детальный разбор отечественной и зарубежной литературы, посвященной оценке разработанности темы исследования и современного состояния проблемы. В первом подразделе освещены медико-социальные аспекты стойкой тугоухости, описана распространенность стойких перфораций барабанной перепонки, основные способы лечения пациентов с данной патологией. Данные обзора указывают на предполагаемую высокую эффективность описанных в настоящее время традиционных хирургических вмешательств, однако демонстрируют достаточно высокий процент повторных вмешательств, подчеркивая актуальность поиска альтернативных подходов с возможностью улучшения морфофункционального результата лечения. Во втором подразделе рассматриваются морфологические и биомеханические свойства барабанной перепонки, их влияние на звукопроводение. Третья часть обзора литературы посвящена доступным в литературе традиционным хирургическим способам закрытия стойких перфораций барабанной перепонки, основным преимуществам и недостаткам отдельных техник. Четвёртый подраздел обзора содержит сведения об экспериментальных и клинических исследованиях, посвященных подходам регенеративной медицины к закрытию стойких перфораций барабанной

перепонки. В нём описаны потенциальные преимущества применения тканеинженерного подхода с использованием факторов роста и скаффолдов. Последний подраздел обзора литературы освещает современное состояние проблемы поиска эффективной модели стойкой перфорации барабанной перепонки.

Во второй главе автор подробно освещает дизайн экспериментальной работы, дает общую характеристику материалов и методов исследования. В этом разделе, в частности, отдельно описано обоснование выбора шиншиллы в качестве лабораторного животного, а также детально описаны условия содержания животных и их соответствие международным нормативам. В общей сложности экспериментальное исследование *in vivo* выполнено на 42 лабораторных шиншиллах и включало в себя два последовательных этапа. Первым этапом автором проведен поиск эффективной воспроизводимой модели стойкой перфорации барабанной перепонки. С этой целью 18 шиншилл разделены на три равные группы, в зависимости от способа формирования перфорации - холодная миринготомия с подворачиванием краев перфорации, лазерная миринготомия, миринготомия с подворачиванием краев перфорации, дополненная временной установкой тимпаностомической трубки. Вторым этапом экспериментальной работы включал исследование на 24 шиншиллах и заключался в оценке эффективности различных способов закрытия сформированных перфораций – в первой группе применяли тканеинженерный подход с использованием коллагенового скаффолда и фактора роста фибробластов, во второй группе – коллагенового скаффолда и физиологического раствора. По окончании периода наблюдения при условии полного закрытия, перепонки извлекались для дальнейшего изучения морфологических и механических свойств. Важно то, что автором детально описан ход извлечения барабанной перепонки, что может быть использовано в дальнейшем при проведении аналогичных экспериментальных исследований. Вторая глава диссертации также содержит подробное описание методов закрытия дефектов. Отдельный подраздел

посвящен описанию современных методов оценки результатов исследования, включая морфологическое исследование с применением различных режимов оптической микроскопии, а также атомно-силовую микроскопию и наноиндентирование с вычислением модуля упругости (модуля Юнга). Главу завершает подробное описание многопланового статистического анализа результатов исследования

Третья глава посвящена первому этапу исследования и содержит более детальное описание методов формирования перфораций, а также результаты проведенного сравнительного исследования в трех группах. Автором показано, что персистирование сформированного дефекта более 8 недель отмечено лишь в третьей группе - холодной мириготомии с подворачиванием краев перфорации и временной установкой тимпаностомической трубки. Несмотря на сложность и более длительный период времени, необходимый для формирования перфораций таким способом, именно данная модель продемонстрировала свою воспроизводимость и эффективность. Все 12 сформированных данным способом перфораций соответствовали критериям стойкой перфорации барабанной перепонки. Морфологическое исследование всех образцов из третьей группы подтвердило подворачивание наружного эпителиального слоя за край дефекта, что подтверждает эффективность выбранной модели.

В четвертой главе приведено детальное описание второго этапа собственного экспериментального исследования эффективности тканеинженерного подхода для закрытия стойких перфораций барабанной перепонки. Для второго этапа работы на 24 шиншиллах сформировано 36 перфораций – 24 правосторонних и 12 левосторонних перфораций. Автор ответственно подходит к оценке эффективности модели стойкой перфорации, а именно все 12 левосторонних перфораций составили третью группу наблюдения, для более длительного наблюдения за сформированными перфорациями. Правосторонние перфорации распределены поровну в две группы лечения: первая - с использованием фактора роста фибробластов, 2 –

с применением физиологического раствора. В обеих группах в качестве скаффолда применена коллагеновая губка. Период наблюдения после закрытия перфораций составлял 12 недель, причем в течение периода наблюдения каждые 2 недели проводилась отоэндоскопия с извлечением конструкта, оценкой состоятельности дефекта и повторением соответствующей процедуры при наличии остаточного дефекта (максимально до 4 раз), что связано с высвобождением фактора роста из коллагенового полимера и его активностью в тканях в течение 2 недель по данным литературы.

В пятой главе приводится анализ результатов исследования. Так, в первой группе лечения полное закрытие дефектов отмечено у всех животных, в то время как во второй группе – лишь в четырех наблюдениях. Помимо существенных отличий в количестве положительных исходов, автор показывает, что сроки закрытия перфораций в группах лечения значительно отличались ($p < 0,05$).

Далее автор приводит результаты оценки морфологических и механических свойств регенератов из разных групп лечения, сравнивая их со свойствами нормальных перепонки. Важно отметить, что морфологические и механические свойства нормальной барабанной перепонки шиншиллы оценивались на 12 правосторонних перепонках, оставленных без вмешательства и составивших референсную (IV) группу исследования.

Автором приведены результаты морфологического исследования регенератов из групп лечения, продемонстрировано полноценное восстановление трехслойной структуры при использовании фактора роста фибробластов. В группе закрытия с использованием коллагенового скаффолда без фактора роста фибробластов регенераты отличались от нативных перепонки более рыхлым фиброзным слоем и неполным восстановлением наружного эпителиального слоя. Далее, автором продемонстрировано, что значения модулей упругости в группе тканеинженерного лечения с использованием фактора роста фибробластов

сопоставимы с референсными показателями ($p=0,07$). В то время как значения модулей упругости регенератов, восстановленных с использованием коллагеновой губки без фактора роста фибробластов, существенно отличались от нормальных значений ($p<0,05$).

В **заключении** суммированы полученные при комплексной оценке морфологических и локальных механических свойств регенератов результаты, проведен их критический анализ и сопоставление с данными других авторов. После обсуждения результатов автором приведены перспективы внедрения описанного тканеинженерного подхода в клиническую практику. В данном подразделе приводится опыт зарубежных коллег, анализ имеющейся законодательной базы, посвященной регулированию методов регенеративной медицины, а также описаны конкретные направления возможного внедрения результатов исследования в клиническую оториноларингологию.

Выводы достаточно аргументированно вытекают из содержания диссертации, полностью отражают результаты исследования, соответствуют поставленным целям и задачам.

Соответствие автореферата содержанию диссертации.

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

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Полученные результаты исследования значимы и вносят научный вклад в преклиническую комплексную оценку эффективности тканеинженерного подхода к закрытию стойких перфораций барабанной перепонки. В тексте встречаются опечатки и грамматические ошибки, которые не носят принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку работы. Неточность подписей к рисунку №5. На отдельные неточности и

погрешности в изложении текста указано автору в устной беседе. Принципиальных замечаний по работе нет.

Имеются некоторые вопросы:

1. Регистрировались ли случаи образования холестеатомы, миграция эпидермиса на внутреннюю поверхность барабанной перепонки? *(в эксперименте подворачивались лоскуты перепонки внутрь тимпанальной полости), что подтверждается в дальнейшем описании исследования (рисунок б автореферат)*

2. Какое влияние оказывал (мог оказывать) фибриновый клей на процесс заживления? Как это могло влиять на достоверность суждений, полученных при оценке результатов исследования?

3. Что происходило с губкой и фибриновым клеем в процессе наблюдения до момента оценки результатов? *(2, 4, 6 и т.д. недель или до момента повторной манипуляции) рассасывалась, отваливалась каким-то конгломератом с губкой, удалялась?*

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Мокоян Жанны Тиграновны на тему «Применение метода тканевой инженерии с использованием фактора роста фибробластов для закрытия стойких перфораций барабанной перепонки» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук является научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научной задачи - экспериментальное обоснование эффективности применения тканеинженерного подхода с использованием фактора роста фибробластов и коллагенового скаффолда в восстановлении морфологических и механических свойств барабанной перепонки, имеющей существенное значение для специальности 3.1.3. Оториноларингология, что 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 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.

03.11. 2022 года.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук (14.01.03 – Болезни уха, горла и носа),

профессор кафедры оториноларингологии ФДПО

ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Минздрава России, руководитель

научно-клинического отдела

патологии уха и основания черепа

ФГБУ НМИЦО ФМБА России  Диаб Хассан Мохамад Али



Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр оториноларингологии Федерального медико-биологического агентства России» (ФГБУ НМИЦО ФМБА России)

Адрес: 123182, г. Москва, Волоколамское шоссе, 30, корпус 2; E-mail: otolar@fmbamail.ru;

Тел.: +7 (499) 968-69-12; Адрес сайта: <http://otolar-centre.ru>