

## **ОТЗЫВ**

**Официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора  
Гарашенко Татьяны Ильиничны на диссертацию Свистушкина Михаила  
Валерьевича на тему «Экспериментальное обоснование применения  
мезенхимных стромальных клеток в лечении рубцовых повреждений  
голосового отдела гортани», представленную на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук по специальности  
14.01.03 – Болезни уха, горла и носа**

### **Актуальность исследования**

Одним из самых сложных разделов оториноларингологии является хирургия рубцовых стенозов гортани и верхних отделов трахеи, направленная не только на восстановление жизненно важной дыхательной функции, но и восстановление голосообразования, как основного коммуникативного свойства человека. Рубцовые повреждения голосового отдела гортани являются сложной проблемой оториноларингологии, ведущей к длительному и часто необратимому нарушению голосовой функции у пациентов. Причинами формирования рубцов голосовых складок являются повреждения гортани в результате бытовых и боевых травм, ожогов, отдельно выделяют ятрогенные повреждения гортани интубации трахеи, длительной ИВЛ, хирургических вмешательств по поводу предраковых и раковых образований гортани, особенно повторные операции при папилломатозе гортани. Итогом данного заболевания нередко является прогрессирующее ухудшение дыхательной функции через ВДП, а усиливающиеся явления стеноза требуют дополнительного наложения трахеостомы, больные становятся хроническими канюленосителями, инвалидами. Реабилитация таких пациентов требует многоходовых хирургических реконструктивных операций, положительный результат от которых иногда может быть получен через много лет, при этом не исключена возможность повторного рестенозирования с неудовлетворительным конечным результатом, требующего расширенных резекционно-пластических операций, в

том числе с участием торакальных хирургов. При локальных гортанных стенозах разработано и внедрено в клиническую практику множество современных способов лечения, позволяющих эффективно улучшить дыхательную функцию, расширить просвет гортани в случае рубцовых стенозов и уменьшить потерю воздуха при фонации, однако достигнуть восстановления акустических характеристик голоса с их помощью практически невозможно. Это связано с исключительно сложным строением собственной пластинки голосовой складки, механические свойства которой обеспечивают амплитудно-частотные характеристики вибраций, возникающих при голосообразовании. В этом плане такая новая отрасль знаний как регенеративная медицина, открывающая значительные перспективы в реабилитации пациентов с рубцами голосовых складок, не может не привлекать внимания хирургов в области ларингологии. Поскольку одно из основных направлений регенеративной медицины – клеточная терапия подразумевает использование потенциала прогениторных клеток различного происхождения для восстановления поврежденного органа. В ряде исследований было показано в отношении рубцов голосовых складок – уменьшение фиброза на месте дефекта при имплантации стромальных клеток жировой ткани, костного мозга, эмбриональных и индуцированных стволовых клеток, 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 лечения рубцов голосовых складок на адекватных животных моделях, изучения процессов регенерации раны и восстановления механических свойств голосовых складок, подбора эффективных клеточных носителей. Появление таких данных позволит эффективно внедрять клеточные технологии в клиническую оториноларингологию. Учитывая вышеуказанное, актуальность работы и цель диссертационного исследования Свистушкина М.В., посвящённого изучению потенциала мезенхимных стромальных клеток в восстановлении морфологических и биомеханических характеристик голосовых складок в эксперименте *in vivo*, не вызывает сомнений.

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

Следует отметить высокий методологический уровень исследования Свистушкина М.В. Набор используемых методов обширен, систематизирован и соответствует поставленной цели и задачам исследования. В диссертации Свистушкина М.В. на основе серии экспериментов последовательно обосновывается концепция возможности применения мезенхимных стромальных клеток костного мозга (МСК) в восстановлении голосовых складок, условно приближенных к нормальному строению :

- 1.усовершенствование экспериментальной модели на лабораторных животных;
2. оценка свойств клеточного носителя на основе фибрина;
- 3.проведение имплантационных операций;
4. оценка кровотока и потери клеток при имплантации;
5. подробное изучение результатов восстановления морфологических и биомеханических свойств голосовых складок.

Большой объём проанализированного материала позволил автору адекватно сформулировать выводы и положения, выносимые на защиту. Практические рекомендации основаны на полученных результатах исследования.

Материалы работы полноценно отражены в 12 публикациях, 5 из которых являются полнотекстовыми статьями в рецензируемых журналах, в том числе 3 статьи из научных изданий, индексируемых Scopus, 2 из них – в зарубежных изданиях. Результаты исследования неоднократно доложены, вызвали значительный интерес у коллег на отечественных и международных научных конференциях.

### **Достоверность и новизна исследования, полученных результатов**

Достоверность результатов работы основана на соответствии дизайна исследования поставленным цели и задачам, достаточном объёме материала исследования и размеров экспериментальных групп, тщательном соблюдении

методик исследования, применении комплекса современных методов оценки результатов и адекватных методов их статистической обработки.

Диссертация Свистушкина М.В. является первым исследованием в нашей стране, в котором проводится экспериментальное обоснование применения мезенхимных стромальных клеток костного мозга в лечении рубцовых повреждений голосового отдела гортани. В рамках работы автором впервые использован клеточный носитель – полиэтиленгликоль (ПЭГ)-фибриновый гель и показаны его преимущества по сравнению с солевым раствором, что обеспечивает уменьшение потери клеток при имплантации в голосовые складки. Важным в исследовании Свистушкина М.В. на экспериментальной модели является то, что впервые проведён комплексный анализ восстановления коллагеновых структур и локальных биомеханических характеристик голосовых складок, репарация которых происходит на фоне имплантированных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (МСК). В данном исследовании впервые проведено обоснование эффективности репарации голосового отдела гортани после иссечения рубцовой ткани в гортани с помощью имплантации аутологичных и человеческих МСК костного мозга в рамках одного исследования, на одной экспериментальной модели с использованием единого дизайна экспериментов.

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

В диссертации Свистушкина М.В. усовершенствована экспериментальная модель рубцового процесса голосовых складок на лабораторных кроликах. Автором доказана её воспроизводимость, подробно описана методология создания и модифицирован необходимый инструментарий. Авторами было показано, что дефект 1/3 голосовой складки с отступом 3 мм от передней комиссуры, через 3 месяца приводит к формированию рубца, границы которого визуальными и тактильными методами хорошо определяются, при этом наличие рубцовой ткани подтверждено гистологическим исследованием. В клинической практике специалисты наиболее часто сталкиваются с рубцами голосового отдела гортани

у пациентов с длительным течением заболевания, кроме того, хирургическое лечение рекомендуется проводить после завершения процессов созревания рубцовой ткани (не ранее 3-6 мес.). С этих позиций данная модель является адекватной и может быть использована в будущих исследованиях, посвящённых экспериментальной разработке методов лечения рубцов голосовых складок.

В практическом отношении важно то, что в исследовании показано влияние клеточных продуктов на интенсивность интраоперационного кровотечения и дыхательных нарушений, что имеет существенное значение не только ввиду важности сохранения клеток в месте имплантации, но и при экстраполяции результатов на условия клинической практики в аспекте прогноза осложнений.

Большая научно-практическая ценность результатов исследования соискателя заключается в комплексе полученных данных по восстановлению морфологии голосовых складок и их механических характеристик под влиянием МСК костного мозга. Ткань, образующаяся на месте дефекта голосовой складки после иссечения рубца и одномоментной имплантации МСК костного мозга, морфологически приближается по структуре к интактным голосовым складкам, чего не отмечено по сравнению с рубцами в контрольных группах, где введение клеток не проводилось. При этом отмечает автор, что статистически значимо уменьшается площадь, толщина и плотность рубца, происходит восстановление расположения, структуры коллагеновых волокон, соотношения коллагена I и III типа. Эти данные подтверждаются оценкой локальных механических свойств. Автором показано, что рубцы голосовых складок, формирование которых происходило в присутствии МСК костного мозга, по модулю упругости не отличаются от нативных, таким образом создается перспектива восстановления колебательного механизма, обеспечивающего восстановление голосообразования.

Полученные соискателем результаты детально раскрывают механизмы восстановления дефектов голосовых складок под влиянием мезенхимных

стромальных клеток костного мозга, внедрение в клиническую практику клеточных технологий с использованием аутологичных костномозговых МСК позволит повысить эффективность лечения пациентов с рубцовыми повреждениями голосового отдела гортани, а выявленные особенности регенерации голосовых складок позволят прогнозировать эффективность лечения.

Основные научные положения, материалы, методы и выводы исследования внедрены в научно-исследовательские работы 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. Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре болезней уха, горла и носа при изучении дисциплины «Инновации в оториноларингологии» для студентов ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

### **Содержание и оформление диссертации**

Диссертация Свистушкина М.В. написана грамотным литературным языком, состоит из введения, обзора литературы, главы посвященной материалам и методам исследования, 3-х глав с результатами собственных исследований, обсуждения, заключения и оценки перспектив внедрения полученных результатов в клиническую практику, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и списка использованных сокращений. Диссертация изложена на 196 страницах машинописного текста. Текст документирован 7 таблицами, 56 рисунками. Указатель литературы содержит 237 наименований, из них 28 отечественных источников и 209 зарубежных.

**Во введении** автором подробно обоснована актуальность исследования, сформулированы цель, задачи и основные положения, выносимые на защиту. Обозначена научная новизна, теоретическая и практическая значимость

исследования, приведены данные о реализации результатов работы, соответствия диссертации паспорту специальности 14.01.03 «Болезни уха, горла и носа». Также во введении отражена степень личного участия автора, результаты публикаций и апробации диссертации на научно-практических мероприятиях.

**Первая глава** представляет собой детальный обзор отечественной и зарубежной литературы, разделённый на несколько подразделов, в которых соискатель оценивает состояние проблемы. В первом – рассматривается микроанатомия голосовых складок, её роль в биомеханике вибраций и формировании голоса. Второй подраздел посвящён анализу опубликованных данных по этиологии и патогенезу рубцов голосовых складок, современным методам диагностики и лечения, из чего определена потребность в поиске новых, эффективных методов восстановления структуры голосовых складок при рубцовых повреждениях. Третья часть обзора посвящена методам регенеративной медицины – анализу имеющихся экспериментальных и клинических исследований, в которых для восстановления голосовых складок с рубцовыми дефектами использовались клеточные технологии. В заключении обзора отражены вопросы, остающиеся открытыми и обосновывающие направления для собственных исследований.

**Глава 2** посвящена материалам и методам, использованным в работе, которая по своему дизайну является контролируемым экспериментальным исследованием с параллельными группами. Эксперименты *in vivo* проводились на лабораторных кроликах в количестве 48 штук, данные животные использовались автором ввиду сходства строения голосовых складок с человеческими.

Первым этапом автором отработывалась воспроизводимость и производилась оптимизация экспериментальной модели рубцов голосовых складок. Экспериментальная модель включала две операции: в ходе первой – формировался односторонний дефект голосовой складки с помощью гортанных щипцов диаметром 2мм, через 3 месяца проводилось второе вмешательство – имплантация клеточного продукта путём инъекции после эксцизии рубца.

Следует подчеркнуть, что такой подход, несмотря на большую трудоёмкость в связи с двумя операциями, соответствует условиям реальной клинической практики, так как хирургическое лечение рубцов голосовых складок следует проводить после завершения репаративных процессов, и нередко повторно после рестенозирования в области гортани. Оптимизация модели заключалась в определении размера дефекта, приводящего к формированию хорошо заметного рубца. С этой целью сравнивались результаты создания дефектов двух размеров – 1) однократного выкусывания в средней 1/3 складки и 2) резекции средней 1/3 голосовой складки. При этом автор получает данные, что выраженный рубцовый процесс формируется при именно избыточном повреждении голосовой складки, что уже является важным в практическом отношении.

Основной блок экспериментов автором разделён на две независимые части на основании источника МСК: в первой применялись аутологичные (собственные) МСК костного мозга животных, во второй – ксеногенные МСК костного мозга человека. В работе с аутологичными МСК соискатель сформировал 2 группы: 6 животных, которым имплантировались суспензия клеток в растворе и равная контрольная группа без имплантации. В экспериментах с МСК человека использовались как клетки в суспензии, так и в комплексе с полиэтиленгликоль-фибриновым гелем. Во втором случае соответственно были сформированы 4 группы: 1) МСК в суспензии; 2) МСК в геле; 3) гель без клеток; 4) контрольная группа. Автор обосновывает использование полиэтиленгликоль-фибринового геля, опираясь на данные обзора литературы, согласно которым этот клеточный носитель (скаффолд) имеет существенное положительное влияние на выживаемость и миграцию клеток. Необходимо указать, что в экспериментах *in vivo* его оценка автором проводится в данном исследовании впервые.

Автором подробно описана методология создания модельного дефекта, забора, культивирования клеток, подготовки клеточных продуктов, техника операций имплантации аутологичных и человеческих МСК, а также используемый хирургический инструментарий. Раздел сопровождается большим количеством наглядного иллюстративного материала.



Отдельный раздел посвящен методам оценки результатов исследования. В нем описаны методы, относящиеся к экспериментальному обоснованию возможностей использования комплекса МСК человека и полиэтиленгликоль-фибринового геля при проведении клеточной терапии рубцовых повреждений гортани: 1) оценка реакции на имплантат при подкожном введении лабораторным крысам, степень его биодegradации на 3 и 7 сутки; 2) исследование интенсивности интраоперационного кровотечения и дыхательных нарушений при проведении имплантации в голосовые складки; 3) оценка сохранения и распределения МСК человека в голосовых складках на 3-й день после имплантации, а также ряд дополнительных параметров. Важным является то, существенная часть данного раздела посвящена описанию методов оценки восстановления морфологических и биомеханических свойств голосовых складок через 3 месяца после имплантации МСК. Для этой цели автор применяет комплекс современных высокоточных и информативных методов. Морфологические исследования проводилась с использованием различных режимов световой микроскопии и окрасок препаратов голосовых складок. Вместе с классическим гистологическим анализом была проведена морфометрия в виде балльной оценки морфологических признаков и измерения толщины рубцов. В исследовании использовался иммуногистохимический анализ коллагенов I и III типов, которые отражают в определенной мере эластические способности голосовых складок. Для исследования ультраструктурных изменений коллагеновых волокон и оценки модуля Юнга препаратов голосовых складок применялась атомно-силовая микроскопия. Оценка механических свойств нативных препаратов голосовых складок проводилась с помощью высокоинформативных методик- наноиндентирования и лазерной виброметрии. Главу завершает подробное описание многопланового статистического анализа данных исследования и используемое для этого программное обеспечение.

**Глава 3** посвящена результатам собственных исследований соискателя. Автором показано, что удаление слизистой оболочки и II-III слоёв собственной пластинки на протяжении  $1/3$  голосовой складки с отступом 3 мм от передней комиссуры приводило к формированию объёмного рубца, который легко

идентифицировался, может встречаться в реальной практике. Полученные данные позволили использовать такой тип дефекта в экспериментах с МСК. При создании дефекта меньшего размера через 3 месяца рубец практически не визуализировался, различия в возможности идентификации рубцов между граппами по данным статистической оценки определены как значимые ( $p < 0,05$ ).

Автор очень ответственно подходит к рекомендуемым методологиям лечения и вводит исследование, которое дополняет основную концепцию работы. В данной главе автор приводит морфологические результаты подкожной имплантации полиэтиленгликоль-фибринового геля, планируемого им носителя МСК. Через 3 и 7 дней имплантат сохранял свою целостную структуру, наблюдались лишь незначительные признаки биодegradации. Это в совокупности с отсутствием воспалительной реакции позволило сделать вывод о его биоинертности в первую неделю. Такое исследование послужило важным этапом предварительной оценки биохарактеристик *in vivo* клеточного носителя перед имплантацией в дефект голосовых складок.

Свистушкиным М.В. установлено, что при проведении имплантации МСК в комплексе с ПЭГ-фибриновым гелем в голосовые складки в группах, где использовался ПЭГ-фибриновый гель, кровотечение было статистически значимо меньше ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группами, где МСК имплантировались в буферном солевом растворе. Автор указывает, что при этом значимые различия по данным оценки дыхательных нарушений между группами обнаружены не были.

На 3-и сутки после имплантации автором оценивается сохранение и распределение клеток в голосовых складках. Для этой цели дополнительно трем животным в группах МСК в суспензии и МСК в геле были имплантированы клетки, трансдуцированные лентивирусом, экспрессирующим флюоресцирующий зелёный белок, свечение которого позволило идентифицировать МСК в препаратах голосовых складок. Данный анализ показал, что введение МСК костного мозга человека, иммобилизованных в ПЭГ-фибриновом гидрогеле, обеспечивало более высокую концентрацию клеток в месте повреждения.

**Четвертая и пятая главы** посвящены оценке результатов восстановления морфологических и механических параметров дефектов голосовых складок. Автором продемонстрированы результаты, достоверно показывающие различия в рубцовой ткани голосовых складок, формируемой под влиянием аутологичных МСК костного мозга. После имплантации аутологичных МСК наблюдалось уменьшение площади рубцов и их разрыхление, коллагеновые волокна были тоньше и, кроме того, имели строение, приближающееся к интактной голосовой складке. Описательная часть морфологического исследования подтверждена значительным объёмом статистического анализа: выявлены значимые различия ( $p < 0,1$ ) по критериям инфильтрации, уменьшения количества фибробластов, дезорганизации и плотности коллагеновых волокон между группами с меньшей альтерацией в рубцах после имплантации МСК. Также автором установлена заметная тенденция к уменьшению толщины рубцов. В группе рубцов без имплантации содержание коллагена III типа было на 45,5% ниже, чем коллагена I типа, а в группе рубцов после имплантации аутологичных МСК наблюдалось восстановление их соотношения, не имевшего различий с интактными складками. Использование высокоинформативного метода атомно-силовой микроскопии позволило соискателю оценить результаты восстановления голосовых складок в микронных масштабах, было показано, что в значительной степени ультраструктура слизистой оболочки после клеточной терапии приближается к морфологической структуре и эластичности интактных складок.

В исследовании с МСК костного мозга человека морфологическое исследование показало, что в группе, где использовался комплекс ПЭГ-фибринового гидрогеля с МСК, отмечалось более выраженное уменьшение общей площади и толщины рубцовой ткани на месте послеоперационного дефекта по сравнению с группами, где были использованы только МСК костного мозга человека в суспензии, ПЭГ-фибриновый гидрогель без клеток, либо имплантации не проводилось. При оценке морфологических критериев автором выявлены достоверные различия между опытной группой МСК с ПЭГ-фибриновым гелем и группой рубцов без лечения по следующим морфологическим признакам. Исследование толщины собственной пластинки

голосовых складок выявило статистически значимое уменьшение толщины рубца у всех трёх опытных групп, где проводилась имплантация при их попарном сравнении с контрольной группой рубцов, при этом наибольшие различия наблюдались группой МСК + ПЭГ-фибриновый гель ( $p < 0,0001$ ).

Данные восстановления морфологии голосовых складок подтверждены исследованием механических характеристик: в группе имплантации МСК человека и фибринового геля не выявлено статистически значимых различий модуля Юнга, среднее значения которого составили  $1.15 \pm 0.25$  кПа, по сравнению с интактными голосовыми складками ( $p = 0,898$ ), в тоже время, по сравнению с остальными группами параметры были статистически значимо ниже ( $p < 0,05$ ). Таким образом на основании этих данных автор приходит к выводу, что рубцовая ткань, образуемая при комбинированной имплантации, по своему строению и механическим параметрам приближается к строению слизистой оболочки интактных голосовых складок

Важно отметить, что в экспериментах с МСК человека автор не использовал иммуносупрессирующую терапию, основываясь на данных обзора литературы об иммуно-привилегированных свойствах МСК и их способности ограничивать интенсивность воспалительного процесса.

**Обсуждение и заключение посвящено** критическому анализу результатов собственных исследований, их сравнению с данными других авторов и их обобщению. После обсуждения автором приводится раздел о перспективах и конкретных направлениях возможного внедрения результатов работы в реальную клиническую оториноларингологию. Данный раздел представляется актуальным и важным ввиду особенностей нормативно-правовых актов, регулирующих применение технологий регенеративной медицины в нашей стране.

Сформулированные диссертантом выводы логично вытекают из содержания диссертации, полностью отражают поставленные в работе задачи, практические рекомендации основаны на полученных результатах исследования.

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

В тексте диссертации имеются единичные опечатки и стилистические неточности, не отражающиеся на восприятии работы.

**В процессе прочтения диссертации возник ряд замечаний к диссертанту:**

1) излишне объемный раздел «Обзор литературы» - 46 стр., который возможно сократить за счет отдельных частей, имеющих косвенное отношение к работе;

2) недостаточно информативно составлены таблицы 5 и 6.

Данные замечания не носят принципиальный характер, не снижают ценности проведенного исследования и не влияют на его качество.

### **Заключение**

Таким образом диссертация Свистушкина Михаила Валерьевича на соискание учёной степени кандидата медицинских наук на тему «Экспериментальное обоснование применения мезенхимных стромальных клеток в лечении рубцовых повреждений голосового отдела гортани», выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора Старостиной С.В. и при научном консультировании доктора химических наук Тимашёва П.С., является завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение актуальной научной задачи – оценки потенциала мезенхимных стромальных клеток в восстановлении морфологических и биомеханических характеристик голосовых складок при рубцовых повреждениях в эксперименте *in vivo*, что имеет существенное значение для оториноларингологии.

По своей актуальности, новизне, методологии, научно-практической значимости диссертация Свистушкина Михаила Валерьевича на тему «Экспериментальное обоснование применения мезенхимных стромальных клеток в лечении рубцовых повреждений голосового отдела гортани» 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), профессор,  
учёный секретарь ФГБУ НМИЦО ФМБА России,  
профессор кафедры оториноларингологии  
ФДПО РНИМУ имени Н.И. Пирогова  
Минздравсоцразвития России

30.11.20



Гаращенко Татьяна Ильинична

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, корп. 2; E-mail: [otolar@fmbamail.ru](mailto:otolar@fmbamail.ru); тел. 8(499)968-69-12; web сайт <http://otolar-centre.ru>

ФГБУ НМИЦО ФМБА России	
Личную подпись	<i>Гаращенко Т.И.</i>
Удостоверяю	
Начальник отдела кадров	<i>[Signature]</i>
	Белоглазова Н.С.

