

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

кандидата медицинских наук, доцента Деева Романа Вадимовича, первого заместителя директора НИИ морфологии человека им. Академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» на диссертацию Гостева Михаила Сергеевича на тему: «Экспериментальное обоснование применения биорезорбируемых персонализированных коллагеновых мембран для закрытия дефектов слизистой оболочки рта» представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.7. Стоматология, 1.5.22. Клеточная биология.

### **Актуальность исследования**

Для закрытия послеоперационных ран слизистой оболочки полости рта разработан большой арсенал материалов биологического происхождения. Экспериментально и в клинической практике доказана их способность к биосовместимости и биоинтеграции. Однако финального решения о наилучшей эффективности того или иного продукта не достигнуто; в основе этого лежит недостаточная удовлетворенность клиницистов при использовании имеющихся методов пластики раневых дефектов слизистой оболочки полости рта. Среди недостатков этих продуктов и (или) методов следует подчеркнуть необходимость формирования дополнительной операционной зоны для забора аутооттрансплантата, усадка или полная резорбция пересаженного материала и др. Это побуждает искать новые подходы к решению проблемы закрытия послеоперационных раневых поверхностей слизистой оболочки полости рта, обеспечивающих надлежащий гистотипический исход лечения.

Значимая доля исследований в этом направлении включает применение коллагенсодержащих мембран; характеристику их свойств: биосовместимости, биодеградации, прочности, эластичности, а также биоинертности, антимикробную эффективность и длительность действия в зоне имплантации. В настоящее время представляет особый интерес разработка и изучение эффективности резорбируемых мембран, в том числе с активными веществами, предотвращающими инфицирование

раны слизистой оболочки полости рта. Комбинации биоматериалов с лактоферрином или другими видами антимикробных пептидов могут стать перспективными для решения проблемы защиты биоматериалов от бактерий со множественной лекарственной устойчивостью.

Вышеперечисленные обстоятельства обусловили своевременность и актуальность исследования Михаила Сергеевича Гостева.

В Институте регенеративной медицины Сеченовского университета разработана новая коллагеновая мембрана, полученная из бычьего ахиллова сухожилия. По мнению автора, персонализация мембраны достигается за счет регулирования структуры материала, в частности, пористости и контроля вставания в него окружающих тканей, степени сшивки коллагеновых волокон и контроля сроков биодеградации в после имплантации.

*Цель исследования* сформулирована широко и предполагает не только получение собственно научных данных, но и практическую их реализацию в виде повышения эффективности лечения пациентов в перспективе. Предлагаемые задачи исследования позволяют достичь указанной цели и включают в себя в т.ч. вопросы клеточной биологии и гистологии, а именно, оценку особенностей раневого процесса, динамику регенерации поврежденных в ходе экспериментальных операций тканей.

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

Диссертационное исследование М.С. Гостева выполнено на высоком методологическом уровне, на стыке двух специальностей, что обеспечено необходимым объемом экспериментального материала, а также адекватным современным дизайном исследования. Все данные, использованные для формирования основных научных положений работы, получены с использованием сертифицированного оборудования и материалов, включающих в себя комплекс физических, гистологических и иммуногистохимических методов с адекватным подбором диагностических антител. В работе применены современные методики математической обработки количественных результатов, статистические критерии использованы после предварительной проверки на нормальность распределения, для

попарного и множественного сравнения использованы соответствующие статистические критерии.

Положения, выносимые на защиту, научно обоснованы полученными данными. Выводы соответствуют поставленным цели и задачам, вытекают из полученных результатов. Работа имеет большую научно-практическую значимость для врачей стоматологов-хирургов, научных работников, занимающихся проблемой регенерации слизистой оболочки после операций в полости рта.

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

Впервые аппаратным способом получены новые данные при изучении механических свойств новых персонализированных коллагеновых мембран: прочность, растяжимость, абсорбция. Автором получены довольно высокие значения прочности на разрыв ( $5,8 \pm 1,3$  МПа) и удлинение при разрыве ( $80,8 \pm 11$  %).

Результаты изучения биологических свойств полученных мембран получены *in vitro*. Установлено, что сшивка химическим агентом не повлияла на токсические свойства персонализированного коллагена. Метаболическая активность клеток для нулевой концентрации и трехкратной концентрации была одинаковой для персонализированного коллагена. Окраска Live/Dead позволила визуализировать наличие жизнеспособных клеток.

Впервые при сравнительном анализе эффективности применения разработанных персонализированных коллагеновых мембран, иностранного аналога и заживления вторичным натяжением для закрытия дефектов слизистой оболочки полости рта в эксперименте на кроликах автором выявлено, что показатели послеоперационного периода и регенерации всех животных имели близкие значения как по выраженности отека и гиперемии на 3, 5 и 7 сутки ( $p > 0,05$ ), так и по срокам эпителизации раневых поверхностей на 7 сутки при использовании коллагеновых материалов и 14 сутки при заживлении вторичным натяжением ( $p < 0,05$ ).

Впервые в эксперименте сравнительный гистологический и иммуногистохимический анализ регенератов слизистой оболочки полости рта кроликов после пластики с применением персонализированных коллагеновых мембран, коллагенового матрикса иностранного производства и при заживлении

раневого поверхности вторичным натяжением показал, что имелось значительное различие в количестве и качестве вновь образовавшихся «мягких тканей» в области применения коллагеновых матриц по сравнению с заживлением вторичным натяжением ( $p < 0,05$ ); между мембранами большее количество вновь образованных кровеносных сосудов было выявлено для персонализированного коллагена (как с лактоферрином, так и без него), которые были схожи с таковыми для мембраны Mucograft. Высокая степень интенсивности регенерационных процессов проиллюстрирована обнаружением большого числа  $\alpha$ -SMA-позитивных клеток, преимущественно фибробластического ряда и гладких миоцитов, а также мощно развитыми пучками коллагеновых волокон межклеточного матрикса по данным окраски по Маллори.

В результате исследования ростовых свойств использованных в исследовании штаммов микроорганизмов (*S. aureus*, *S. mutans*, *C. albicans*) выявлены незначительные отличия в продолжительности основных фаз роста и способности накопления биомассы для всех трех коллагеновых матриц, при этом лучшие результаты в отношении снижения микробной обсемененности, в том числе и динамику этого процесса, продемонстрировали мембраны с лактоферрином.

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

Проведенное экспериментальное исследование показало не менее высокую эффективность применения разработанных коллагеновых мембран на основе ахиллова сухожилия по сравнению с известным аналогом иностранного производства. Клинически не было получено существенных статистически значимых различий между разработанными мембранами, контрольной матрицей и заживлением вторичным заживлением, однако по данным гистологического исследования при использовании мембран с лактоферрином вновь образованные «мягкие ткани» отличались полнотой и зрелостью. Регенераты слизистой оболочки при использовании персонализированного коллагена и коллагенового матрикса Mucograft были схожи по строению и степени зрелости.

Впервые были выявлены различия в регенерации при изучении биоптатов регенератов слизистой оболочки с нёба и вестибулярной части нижней челюсти с имплантированными в них 3 различными мембранами. При использовании

коллагенового матрикса Mucograft репаративные процессы, формирование соединительной ткани и неоангиогенез шли умеренным темпом и были заметны преимущественно на периферии имплантата, некротических и воспалительных изменений не отмечали. При имплантации мембраны из персонализированного коллагена наблюдали+ выраженные некротические и иммунные реакции, формирование соединительной ткани и сосудов было медленным. При использовании мембраны из персонализированного коллагена с добавлением лактоферрина отмечали уменьшение выраженности некротических процессов и иммунных реакций, а также более интенсивное формирование и созревание коллагеновых волокон в месте имплантации и образование сосудов.

В результате исследования ростовых свойств использованных в исследовании штаммов микроорганизмов можно констатировать незначительные отличия в продолжительности основных фаз роста и способности накопления биомассы. Схожие ростовые свойства штаммов различных родов и видов в планктонной культуре могут иметь существенные различия при формировании биопленок. Выявлено значительное превалирование антибактериальной устойчивости при использовании коллагеновой мембраны с лактоферрином, что особенно важно при проведении операций в полости рта.

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Работа соответствует паспортам научных специальностей 3.1.7. Стоматология, области науки: медицинские науки, пунктам 2 и 8 направлений исследования, и 1.5.22 Клеточная биология, пунктам 10 и 14 направлений исследования.

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

Результаты выполняемого исследования полностью отражены в 8 работах, в том числе 3 научных статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета. Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 1 статья в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus, 4 публикации в сборниках

материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 2 зарубежных конференций).

### **Характеристика структуры и оценка содержания диссертации**

Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Работа проиллюстрирована 25 рисунками и содержит 16 таблиц. Список литературы включает 231 литературный источник, из них 40 российских и 191 зарубежных.

Во введении автор обосновывает актуальность и степень разработанности темы исследования, теоретическую и практическую значимость. Автором четко сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, положения, выносимые на защиту.

Глава «Обзор литературы» написана с привлечением большого количества источников литературы. В обзоре литературы приводятся сведения по современному состоянию вопроса применения мембран для закрытия раневых поверхностей «мягких тканей» полости рта, описал дефекты слизистой оболочки полости рта, причины их возникновения, методы лечения. Подробно описаны методы получения коллагеновых мембран, их преимущества и недостатки. Этика цитирования работ соблюдена, включение данных в литературный обзор обосновано, а анализ литературных данных в целом обосновывает актуальность выбранного направления исследования. Глава написана грамотно, в научном стиле, читается с интересом.

Вторая глава «Материал и методы исследования» содержит подробную характеристику методов исследования и подробное описание экспериментального и лабораторного материала. Указаны методы лабораторных исследований механических свойств разработанных коллагеновых мембран: прочность, растяжимость, абсорбция, исследования на цитотоксичность. Представлено распределение животных по группам исследования, описаны методы операций с качественными иллюстрациями. Результаты морфологического, иммуногистохимического и микробиологического методов исследования проиллюстрированы качественными информативными фотографиями. Кроме этого, для характеристики структуры мембран выполнена сканирующая электронная

микроскопия.

Источником животных явился питомник ФГБУ «ВГНКИ». Важно, что автор соблюдает принятые правила гуманного обращения с животными, а протокол исследования утвержден этической комиссией Сеченовского университета. Представлены современные методы адекватной статистической обработки. Весь материал изложен логично и четко.

В главе «Результаты собственных исследований» представлены собственные полученные данные. Результаты гистологического и иммуногистохимического методов свидетельствуют о высоком качестве регенерата, а также указывает на низкую степень местно-раздражающего действия имплантированных коллагеновых материалов на окружающие ткани. При окраске по Маллори в дерме в области имплантации коллагеновой мембраны из персонализированного коллагена и персонализированного коллагена с лактоферрином наблюдали увеличение доли пучков коллагеновых волокон, что указывает на высокую степень синтеза межклеточного матрикса.

Проведенный сравнительный анализ микробного роста на примере условно-патогенных микроорганизмов полости рта, колонизировавших поверхность различных коллагеновых мембран, показал их допустимые значения на всех сроках исследования (до 7 суток), что особенно важно для регенерации «мягких тканей» в условиях потенциальной микробной контаминации.

Далее автор анализирует полученные данные, проводит их обсуждение, дискутируя с другими авторами. Следует указать, что качество гистологических препаратов надлежащее; иммуногистохимические реакции достоверны.

Выводы и практические рекомендации лаконичны и вытекают из полученных результатов, полностью соответствуют цели и задачам исследования.

#### **Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат полностью отражает все положения и результаты диссертационной работы, оформлен в соответствии с требованиями, хорошо иллюстрирован.

В целом работа заслуживает положительной оценки.

### **Замечания по диссертационной работе**

Принципиальных замечаний к работе нет. Вместе с тем, следует указать автору на большое число опечаток в текстах диссертации и автореферата. Также текст нуждается в стилистической коррекции. НЕ всегда соблюдена ориентация микрофотографий и надлежащее информативное увеличение; однако это не вредит пониманию гистологических процессов специалистом.

В порядке дискуссии важно получить ответы на следующие вопросы.

1. Чем обусловлен выбор линий NIH 3T3 и MCK из пупочного канатика для проведения теста прямой цитотоксичности?

2. Что послужило прототипом или основанием к оценке регенерации по особой 4-балльной шкале?

3. Как автор может охарактеризовать сходства и различия ангиогенеза при заживлении раневых дефектов? Каким образом проводилась морфометрия кровеносных сосудов и каково по мнению автора значение этих данных для понимания особенностей регенерации?

### **Заключение**

Диссертационная работа Гостева Михаила Сергеевича на тему: «Экспериментальное обоснование применения биорезорбируемых персонализированных коллагеновых мембран для закрытия дефектов слизистой оболочки рта» представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.7. Стоматология, 1.5.22. Клеточная биология, выполненная под научным руководством к.м.н., доцента Дьячковой Екатерины Юрьевны и д.х.н., доцента Тимашева Петра Сергеевича, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи получения данных для повышения эффективности лечения пациентов с обширными операционными раневыми дефектами слизистой оболочки рта путем научного обоснования применения разработанной персонализированной коллагеновой мембраны из бычьего ахиллова сухожилия в эксперименте, имеющей существенное значение для специальностей 3.1.7. Стоматология и 1.5.22. Клеточная биология (медицинские науки), 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 № 0692/Р от 06.06.2022 г. (с изменениями, утвержденными приказом ректора №1179 от 29.08.2023 г., приказом Сеченовского Университета № 0787/Р от 24 мая 2024 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Гостев Михаил Сергеевич заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям - 3.1.7. Стоматология и 1.5.22. Клеточная биология.

Официальный оппонент:

Первый заместитель директора НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», кандидат медицинских наук (03.00.25 - Клеточная биология)

117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3  
Телефон: 8(499) 120-43-03  
e-mail: romdey@gmail.com

Деев Роман Вадимович

«24» августа 2024 г.

Подпись, степень, звание к.м.н., доцента Р.В. Деева заверяю.

«24» августа 2024 г.

Учёный секретарь ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»,  
доктор медицинских наук



Михайлова Анна Андреевна

119991, Москва, ГСП-1, ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»,  
Абрикосовский пер., д. 2.  
телефон: 8 (499) 246-88-57  
e-mail: nos@med.ru