

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Ахтямова И.Ф. на диссертацию Анастасиевой Евгении Андреевны «Замещение костных дефектов тканеинженерной конструкцией на основе депротеинизированной губчатой кости (экспериментальное исследование)», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.8. – травматология и ортопедия.**

### **Актуальность темы исследования**

Количество операций с использованием остеопластических материалов ежегодно возрастает, что объясняется увеличением числа высокотехнологичных операций, реконструктивных вмешательств при костной патологии, деформациях костей, а также дефектах тканей, полученных в результате боевых травм. Важным аспектом восстановления костной ткани в зоне дефекта или дефицита костной ткани является правильный выбор костно-пластического материала для восстановления структурно-функциональных свойств кости.

Развитие тканеинженерных технологий и ортобиологии, как отдельного направления медицины позволяет создавать конструкции для костной пластики с заданными свойствами. Тканеинженерная конструкция представляет собой биомедицинский продукт, который состоит из клеток (клеточных линий), биосовместимого материала и вспомогательных веществ. Таким образом, разработка наиболее эффективной тканеинженерной конструкции для восстановления костной ткани является востребованным направлением. Исходя из данных литературы одной из наиболее перспективных можно считать разработку и использование комбинированных тканеинженерных конструкций на основе депротеинизированной губчатой кости и мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани (МСК ЖТ) в качестве активного компонента с целью активации механизмов репаративного остеогенеза.

### **Новизна исследования и полученных результатов**

Научная новизна данного исследования заключается в том, что изучены структурные характеристики, элементный состав и цитотоксичность депротеинизированной губчатой кости (способа обработки в соответствии с патентами RU 2232585 C2, RU 2223104 C2, RU 2640932 C2 в лаборатории заготовки и консервации тканей ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна»). Впервые изучено влияние исследуемой депротеинизированной губчатой кости на адгезию, миграцию и пролиферацию мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека в эксперименте *in vitro*.

Соискателем разработан способ создания тканеинженерной конструкции на основе депротеинизированной губчатой кости для стимуляции регенерации кости (Патент

№2801471 от 09.08.2023). И впервые в эксперименте *in vivo* изучено замещение дефекта кортикального слоя кости разработанной тканеинженерной конструкцией.

### **Обоснованность научных положений и выводов**

Достоверность основных положений и выводов в диссертации Анастасиевой Е.А. базируется на данных проведенных экспериментов, *in vitro* и *in vivo*.

Материалом исследования являлись фрагменты губчатой костной ткани головки бедренной кости, способа обработки в соответствии с патентами RU 2232585 C2, RU 2223104 C2, RU 2640932 C2 в лаборатории заготовки и консервации тканей ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна». В работе использовали 20-ть срединных смежных распилов площадью  $1,0 \text{ см}^2 \pm 5\%$  и толщиной  $0,4 \text{ см} \pm 5\%$  -для исследования пористости костной ткани и ее элементного состава, и по 10-ть фрагментов кубической формы,  $1,0 \text{ см}^3$  -для проведения МТТ-теста на цитотоксичность и исследования свойств МСК-ЖТ. По 4 фрагмента для разработки способа создания тканеинженерной конструкции. Для изучения замещения дефекта костной ткани в эксперименте *in vivo* КПМ использовали в виде фрагментов в соответствии с размерами костного дефекта.

Материал для лучевой диагностики и гистологического исследования при ортотопической имплантации образцов в эксперименте *in vivo*: участок бедренной кости области заполнения костных дефектов в сроки 2, 4 и 6-й недели после операции.

Цитотоксичность депротеинизированной губчатой кости оценивали с помощью МТТ-теста в эксперименте *in vitro*, в качестве тестовой культуры использовали стерильную культуру дермальных фибробластов человека 4-5 пассажа (раздел работы выполнен в лаборатории биотехнологий университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России).

Оценку структурных характеристик образцов депротеинизированной губчатой кости осуществляли на металлографическом инвертированном микроскопе «Альтами МЕТ 1МТ» (Россия, Санкт-Петербург), определяли параметры пор по фотоизображениям, полученным посредством макрофотосъемки при различной глубине фокуса и рассчитывали общую пористость (раздел работы выполнен в лаборатории физики наноструктурных биоконструкций ФГБУН «Институт физики прочности и материаловедения» СО РАН).

С целью изучения адгезии, миграции и пролиферации МСК ЖТ человека на образцах депротеинизированной губчатой кости в эксперименте *in vitro* использовали стерильную культуру 3 пассажа (раздел работы выполнен в лаборатории биотехнологий университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России) .

Эксперимент *in vivo* выполнен на 24 кроликах линии NZW (раздел работы выполнен на базе ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова» СО РАН). Сформировано три группы исследования: контрольная группа — моделирование костных дефектов в участках диафиза бедренной кости без заполнения; группа с замещением костного дефекта депротеинизированной губчатой костью; и третья группа — с замещением костного дефекта диафиза бедренной кости тканеинженерной конструкцией на основе депротеинизированной губчатой кости со стромально-васкулярной фракцией жировой ткани кролика (согласно технологии «Autologous conditioned plasma-SVF» (ACP-SVF) (патент US10512659B2). Дизайн исследования полностью соответствует действующим международным стандартам проведения лабораторных исследований ISO 10993-2-2009.

По результатам лучевой диагностики и гистологического исследования было доказано, что использование разработанной тканеинженерной конструкции на основе депротеинизированной губчатой кости со стромально-васкулярной фракцией позволяет усовершенствовать метод замещения костных дефектов за счет восстановления кости в более ранние сроки.

Выводы и положения на защиту представлены аргументированно и научно обоснованы, все разделы работы имеют статистическую обработку с уровнем достоверности результатов в группах исследования. Это позволяет сделать заключение о достоверности представленных результатов.

#### **Внедрение результатов исследования. Опубликование основных результатов в печати**

Основные материалы и положения работы представлены на научно-практических конференциях, в том числе с международным участием в период с 2017 по 2023 год. По теме диссертационного исследования опубликовано 14 научных работ, в том числе – 4 в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, из них 4 в журналах, индексируемых в международной базе данных WoS. Получен патент на изобретение РФ №2801471 от 09.08.2023 «Способ создания тканеинженерной конструкции для стимуляции регенерации кости». Опубликовано 1 учебное пособие.

Полученные результаты исследования используются в лекционных курсах для аспирантов и ординаторов ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, кафедры травматологии и Новосибирского государственного медицинского университета Минздрава России.

**Структура и содержание диссертации.** Диссертационная работа изложена на 134 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов,

списка сокращений и условных обозначений, списка использованной литературы, приложения. Работа иллюстрирована 45 рисунками, 19 таблицами. Библиографический список использованной литературы представлен 232 источниками, из них 81 отечественных и 151 иностранных.

Во введении обосновывается актуальность работы, автором определены цели и задачи исследования, представлена научная новизна исследования и его научная, а в перспективе и практическая значимость. Автором сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен обзор литературы, приводятся данные отечественных и зарубежных работ и обзоров с 2012 по 2022. Автором рассматриваются данные по темам замещения костных дефектов, использованию минимально-манипулированных продуктов и мезенхимальных стромальных клеток (МСК). Автором приводятся основные преимущества и недостатки используемых костнопластических материалов. Так же приводятся аргументы в пользу выбора стромально-васкулярной фракции (SVF) жировой ткани в качестве клеточного компонента тканеинженерной конструкции. Глава завершается заключением, что тканеинженерные конструкции для замещения дефектов на основе депротенизированной губчатой кости в экспериментах на эвотных ранее не изучались в полной мере, что обуславливает актуальность настоящего исследования.

Вторая глава описывает материалы, методы и этапы экспериментального исследования. Автором изложен последовательный подход к научной работе, где на каждом этапе решается конкретная задача.

В третьей главе представлены результаты исследования *in vitro*. Приводятся данные изучения структурных характеристик и элементного состава ДПК, подраздел главы завершается итогами проведенного анализа результатов тестов на наличие цитотоксичности изучаемой ДПК. Автор последовательно переходит к следующему подразделу, результаты которого позволят оценить теоретическую возможность использования ДПК как основы для тканеинженерной конструкции – приводятся результаты изучения влияния ДПК на характеристики МСК жировой ткани *in vitro*. Результаты на данном этапе позволяют автору логично перейти к описанию разработки способа создания тканеинженерной конструкции для стимуляции регенерации кости. Приводится ссылка на приложение А диссертации - Патент №2801471 от 09.08.2023.

В четвертой главе приводятся результаты следующего этапа работы - результаты эксперимента *in vivo*. Автор работы приводит показатели костной плотности в области исследования по результатам МСКТ. Изученные данные лучевой диагностики были статистически проверены, подтверждены при помощи гистологического исследования.

Подраздел резюмируется тем, что при использовании тканеинженерной конструкции восстановление рентгеновской плотности кости до показателя D1 по шкале Misch ( $p = 0,045$ ) происходит к сроку наблюдения 6 недель, что соответствует показателям толстой компактной кости по классификации Misch. По результатам гистологического исследования приводятся данные об увеличении показателей объёмной плотности зрелой и новообразованной костной ткани. Приводится статистическое обоснование превосходства показателей, полученных в группе исследования с использованием тканеинженерной конструкции.

Диссертация завершается обсуждением полученных результатов в разделе «Закключение», которое подводит итог всему исследованию.

В четырех выводах сформулированы основные результаты экспериментального исследования, которые в полной мере соответствуют задачам поставленного исследования и раскрывают поставленную цель работы.

По результатам полученных в ходе написания диссертации опубликовано 14 научных статей, из них 4 в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации, из них 4 в журналах, индексируемых в международной базе данных WoS. Получен патент на изобретение РФ №2801471 от 09.08.2023 «Способ создания тканеинженерной конструкции для стимуляции регенерации кости». Опубликовано 1 учебное пособие. Авторство соискателя в работах не вызывает сомнений.

Таким образом, в работе автором сформирован фундаментально-прикладной задел, который может быть использован для создания тканеинженерной конструкции для замещения костных дефектов. В перспективе результаты исследования могут быть использованы в клинической практике.

**В ходе рецензирования возникли ряд замечаний и вопросов по диссертации:**

1. Возможно ли было проведение данного исследования не только по результатам лучевой диагностики, но и гистологическим изучением тканей?
2. Положение на сегодня позволяет проводить чисто экспериментальные исследования по нашей специальности, однако как скоро возможно проведение клинического исследования основываясь на результатах Вашего исследования?
3. Принципиальных замечаний к работе нет, однако по тексту диссертации встречаются опечатки, что не влияет на суть и достоверность изложенного материала. Положения на защиту раскрыты в достаточной мере. Практическим рекомендациям по материалам диссертации требуют подтверждения в клинике, но это уже дальнейшее продолжение

темы с проведением дополнительных методов оценки эффективности предлагаемых биометариалов.

### **Заключение**

Диссертационная работа Анастасиевой Евгении Андреевны «Замещение костных дефектов тканеинженерной конструкцией на основе депротеинизированной губчатой кости (экспериментальное исследование)», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.8. – травматология и ортопедия, является законченной квалификационной работой, в которой на основании выполненных авторами исследований решена важная научно-практическая задача – усовершенствования метода замещения костных дефектов путем использования тканеинженерной конструкции на основе депротеинизированной губчатой кости.

Диссертационная работа Анастасиевой Е.А. по своей актуальности, теоретическому уровню, научной новизне, способу решения поставленных задач и практической значимости соответствует требованиям ВАК Министерства образования и науки РФ (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление правительства РФ №842 от 24.09.2013 г., ред. Постановления правительства РФ №335 от 21.04.2016)), предъявляемым диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.8. – травматология и ортопедия.

### **Официальный оппонент:**

**Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой травматологии, ортопедии и хирургии экстремальных состояний, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России.**

 **Ахтямов Ильдар Фуатович**

**Докторская диссертация защищена по специальности 3.1.8. – травматология и ортопедия (медицинские науки)**

**Подпись д.м.н. профессора Ахтямова И.Ф. заверяю**  
**Ученый секретарь ФБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России**  
**д.м.н. профессор**

 **И.Г. Мустафин**

**« 7 » ноября 2023г.**

**Адрес организации:** ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России; 420012, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Бутлерова, д.49, Тел. +7(843) 236 06 52; <https://kazangmu.ru>; [rector@kazangmu.ru](mailto:rector@kazangmu.ru)