

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента доктора медицинских наук Брижань Л.К.,  
заместитель начальника госпиталя по научно-исследовательской работе  
Федерального государственного бюджетного учреждения «Главный  
военный клинический госпиталь им. ак. Н.Н. Бурденко» Министерства  
обороны Российской Федерации,  
на диссертацию Анастасиевой Евгении Андреевны  
«Замещение костных дефектов тканеинженерной конструкцией на  
основе депротенизированной 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 костнопластических 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 (КПМ) для восстановления структурно-функциональных свойств кости.

Развитие тканеинженерных технологий и ортобиологии, как отдельного направления медицины позволяет создавать конструкции для костной пластики с заданными свойствами. Разработка наиболее эффективной конструкции для восстановления костной ткани является востребованным направлением в современной медицине. Исходя из данных литературы одной наиболее перспективными можно считать конструкции на основе депротенизированной губчатой кости и мезенхимальных стромальных клеток в качестве активного компонента с целью активации механизмов репаративного остеогенеза.

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

Научная новизна данного исследования заключается в том, что в комплексе изучены структурные характеристики, элементный состав и цитотоксичность депротенизированной 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 депротенизированной губчатой кости (данного способа обработки) на адгезию, миграцию и пролиферацию мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека в эксперименте *in vitro*. Автором разработан способ создания тканеинженерной конструкции на основе депротенизированной губчатой кости для

стимуляции регенерации кости (Патент №2801471 от 09.08.2023). Затем впервые в эксперименте *in vivo* изучено замещение дефекта кортикального слоя кости разработанной тканеинженерной конструкцией.

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

Работа состоит из трех этапов. Первый – изучение структуры и элементного состава депротенизированной губчатой кости как потенциальной основы для тканеинженерной конструкции. Вторым этапом выполнены эксперимент *in vitro* с дермальными фибробластами человека для определения отсутствия ее цитотоксического действия на клетки, кроме того с культурой МСК жировой ткани определены такие свойства как адгезия, миграция и пролиферация клеток на образцах депротенизированной губчатой кости. Данные предварительные этапы логично предваряют затем выполненные эксперименты *in vivo* на кроликах. Третий этап – эксперимент на кроликах продемонстрировал эффективность использования тканеинженерной конструкции для замещения костных дефектов. Достоверность основных положений и выводов в диссертации Анастасиевой Е.А. базируется на данных проведенных экспериментов.

Материалом исследования являлись фрагменты губчатой костной ткани головки бедренной кости, способ обработки в соответствии с патентами RU 2232585 С2, RU 2223104 С2, RU 2640932 С2 в лаборатории заготовки и консервации тканей ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна». Материал для лучевой диагностики и гистологического исследования при костной пластике в эксперименте *in vivo*: участок бедренной кости области заполнения костных дефектов. Результаты были оценены в сроки 2, 4 и 6 недель после операции.

Оценены структурные характеристики и элементный состав образцов депротенизированной губчатой кости, раздел работы выполнен в лаборатории физики наноструктурных биоконструкций ФГБУН «Институт физики прочности и материаловедения» СО РАН.

Оценена цитотоксичность *in vitro* на культуре дермальных фибробластов человека, раздел работы выполнен в лаборатории биотехнологий университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России). Изучена адгезия, миграция и пролиферация МСК-ЖТ человека на образцах депротенизированной губчатой кости, 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. Исследование проведено при формировании трех групп исследования:

- контрольная группа— моделирование костных дефектов в участках диафиза бедренной кости без заполнения;

- группа с использованием депротенизированной губчатой кости (способ 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») для замещения костного дефекта диафиза бедренной кости;

- группа с использованием тканеинженерной конструкции на основе депротенизированной губчатой кости (способ 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») со стромально-васкулярной фракцией жировой ткани кролика (согласно технологии «Autologous conditioned plasma-SVF» (ACP-SVF) (патент US10512659B2) для замещения костного дефекта диафиза бедренной кости.

Дизайн исследования соответствует действующим международным стандартам проведения лабораторных исследований ISO 10993-2-2009. По результатам исследования методами лучевой диагностики и результатам гистологического исследования было доказано, что использование разработанной тканеинженерной конструкции на основе депротенизированной губчатой кости со стромально-васкулярной фракцией позволяет усовершенствовать метод замещения костных дефектов за счет восстановления кости в более ранние сроки. Обоснованность научных положений и выводов не вызывает сомнений.

#### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

В ходе работы сформирован фундаментально-прикладной задел, который может быть использован для создания тканеинженерной конструкции на основе депротенизированной губчатой кости со стромально-васкулярной фракцией жировой ткани, которая относится к минимально-манипулированным клеточным продуктам (согласно консенсусу «Минимально манипулированные клеточные продукты» от 2021г).

Выводы и положения на защиту представлены аргументированно, научно обоснованы, научная новизна не вызывает сомнений. Это позволяет считать, что результаты, представленные в диссертации Е.А. Анастасиевой экспериментально подтверждены и могут в перспективе быть использованы для клинической практики в лечебных учреждениях травматолого-ортопедического профиля.

#### **Внедрение результатов исследования. Публикация 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** обоснована актуальность работы, определены цели и задачи исследования, показана научная новизна и практическая значимость, сформированы основные положения, выносимые на защиту.

**В первой главе (обзор литературы)** приводятся данные поисковых работ и обзоров с 2012 по 2022 по принципам замещения костных дефектов, формированию тканеинженерных конструкций. Автором приведены характеристики типов костных матриц с описанием их преимуществ и недостатков, обоснован выбор стромально-васкулярной фракции жировой ткани в качестве клеточного компонента тканеинженерной конструкции.

**Во второй главе (материалы и методы исследования)** описан дизайн исследования, данные изложены в соответствии с этапным мультиметодным подходом экспериментального исследования. Описаны группы исследования. Представленные методы исследования соответствуют задачам.

**В третьей главе** представлены результаты исследования *in vitro*. Приводятся данные изучения структурных характеристик и элементного состава депротенизированной 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». По результатам анализа результатов МТТ-теста определено, что материал не цитотоксичен.

В эксперименте *in vitro* изучено влияние образцов исследуемой депротенизированной губчатой кости на характеристики мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани.

Изложены результаты разработки способа создания тканеинженерной конструкции для стимуляции регенерации кости – Патент №2801471 от 09.08.2023).

**В четвертой главе** изложены результаты эксперимента *in vivo*. Изучены показатели костной плотности в области замещения дефекта кортикальной пластины. Проведен полноценный анализ и доказано, что при использовании тканеинженерной конструкции восстановление

рентгеновской плотности кости до показателя D1 по шкале Misch ( $p = 0,045$ ) происходит к сроку наблюдения 6 недель, по сравнению аналогичными показателями в группе с использованием депротенизированной губчатой кости и без замещения дефекта (контроль).

Данные лучевой диагностики были подтверждены при помощи гистологического исследования материала. Проанализированы показатели: численной плотности сосудов (Nai), из них процент полнокровных сосудов в зоне замещения (%), объемная плотность зрелых коллагеновых волокон (Vv %), объемная плотность аргирофильных соединительнотканых волокон (Vv %), объемная плотность костной ткани зрелой и новообразованной (Vv%). Анализ показателей проведен при помощи исчерпывающего количества статистических методик, что не вызывает сомнения в их достоверности.

В заключении проводится обобщающий анализ проведенного исследования, подводятся итоги научной работы. Выводы логично вытекают из результатов исследования, соответствуют поставленным задачам. В четырех выводах основные положения работы, определяющие её теоретическую и, в перспективе, практическую ценность.

**В ходе рецензирования работы возник ряд замечаний, а также вопросов, которые лишь подчеркивают ее значимость:**

1. По тексту диссертации имеются опечатки, однако это никак не влияет на суть, логику и достоверность изложенного материала.
2. В ходе исследования использовались МСК жировой ткани, не является ли более перспективным применение МСК костного мозга?
3. Для чего проводился анализ элементного состава депротенизированной губчатой кости?
4. Использовались ли результаты исследования в клинической практике?

### **Заключение**

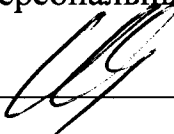
Диссертационная работа Анастасиевой Евгении Андреевны «Замещение костных дефектов тканеинженерной конструкцией на основе депротенизированной губчатой кости (экспериментальное исследование)», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.8. – травматология и ортопедия, является законченной научно-квалификационной работой. В работе на основании выполненных автором исследований решена важная научно-практическая задача, имеющая существенное значение для медицинской науки и клинической практики – сформирован фундаментально-прикладной задел, который может быть использован для создания тканеинженерной конструкции со стромально-васкулярной фракцией жировой ткани. Результаты работы позволяют усовершенствовать метод замещения костных дефектов путем использования тканеинженерной конструкции на основе депротенизированной губчатой кости.

Диссертационная работа Анастасиевой Е.А. выполнена на современном научно-методическом уровне. По своей актуальности, научной и практической значимости, объему выполненных исследований, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов соответствует требованиям ВАК Министерства образования и науки РФ п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации от 24.09.2013 №842, редакции постановления правительства Российской Федерации от 21.04.2016 №335, предъявляемым диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а соискатель заслуживает искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.8. – Травматология и ортопедия.

Официальный оппонент:

заместитель начальника госпиталя по научно-исследовательской работе  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
«Главный военный клинический госпиталь им. академика Н. Н. Бурденко»  
Министерства обороны Российской Федерации, доктор медицинских наук  
(3.1.8.Травматология и ортопедия), профессор

Согласен на обработку моих персональных данных

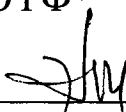
  
Брижань Леонид Карлович

« 01 » 11 2023г.

Подпись д.м.н. профессора Брижаня Л. К. заверяю:

Врио начальника отдела кадров ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь им. академика Н. Н. Бурденко» МО РФ



  
М.М.Зизюкин

« 1 » 11 2023г.

**Адрес организации:**

ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь им. ак. Н.Н. Бурденко»  
Министерства обороны Российской Федерации, 105094, Москва,  
Госпитальная площадь, д. 3, Тел. +7 (499) 263-55-55  
<https://gvkg.ru> ; [gvkg@mail.ru](mailto:gvkg@mail.ru)