

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

доктора медицинских наук, доцента Астрелиной Татьяны Алексеевны на диссертационную работу Ли Валерия Герасимовича «Разработка и экспериментальное обоснование технологии децеллюляризации и криоконсервации роговичных лентикул для кераторефракционной хирургии», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.5. – офтальмология, 3.1.14. – трансплантология и искусственные органы

### **Актуальность избранной темы**

Диссертационная работа Ли В.Г. посвящена решению актуальной проблемы офтальмологии и фундаментальной медицины – разработке принципиально новой технологии криоконсервации децеллюляризированной лентикулы для рефракционной хирургии роговицы.

В настоящее время остается не решенной проблема острой нехватки донорских роговиц в глазных банках. Исследования в разных странах демонстрируют возможность использования роговичных лентикул, полученных в ходе рефракционной операции СМАЙЛ для лечения патологических состояний роговицы в ходе кераторефракционных вмешательств.

В большинстве случаев в рефракционных целях используются аллогенные лентикулы, содержащие остаточные клеточные и ядерные компоненты, которые впоследствии могут вызвать реакции иммунного отторжения тканей после их трансплантации в строму роговицы хозяина.

В последние годы непрерывно растет интерес к области регенеративной и тканевой инженерии роговицы. К данным технологиям относятся методы децеллюляризации тканей, позволяющие максимально удалять остаточные клетки из ткани при минимальном воздействии на коллагеновый каркас ткани. Помимо этого, область технологии криохранения роговичных тканей стремительно развивается и пользуется большим интересом в научном сообществе.

На сегодняшний день в литературе не описаны подходы к криоконсервации децеллюляризованных роговичных лентикул, отсутствуют сообщения о математически обоснованных формулах и диаграммах, позволяющих использовать лентикулы для кераторефракционной хирургии.

В связи с этим разработка новых технологий криоконсервации децеллюляризованных роговичных лентикул, а также возможность их использования для кераторефракционной хирургии представляют несомненную значимость для клинической офтальмологии и фундаментальной медицины.

Актуальность и значимость проведенных исследований подтверждается достаточным количеством работ, опубликованных по теме диссертационного исследования.

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

Достоверность полученных результатов не вызывают сомнений, так как исследование выполнено с использованием достаточного количества экспериментального материала и с применением современных лабораторно-диагностических методов исследования. Исследования проведены в необходимом объеме, статистический анализ полученных результатов подтверждает их значимость и достоверность. Положения, выносимые на защиту, научно обоснованы, подтверждены полученными результатами, имеют значимый как прикладной, так и фундаментальный характер для офтальмологии и медицины. Диссертационная работа составлена логично, методологически верно определены цель и задача исследования. Выводы и практические рекомендации сделаны в соответствии с полученными результатами.

#### **Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

В ходе выполнения представленного диссертационного исследования получены результаты и сформулированы положения, обладающие несомненной научной новизной.

Впервые разработан оригинальный способ транспортировки лентикулярного материала в дисперсном вискоэластике, позволяющий получать высокие показатели прозрачности материала для спектрофотометрического исследования. Проведенный сравнительный анализ протоколов децеллюляризации лентикулярного материала, полученного в ходе операции СМАЙЛ показал, что протоколы децеллюляризации с использованием 1.5M NaCl с нуклеазами и 0,1% SDS характеризуются воспроизводимостью, низкой иммуногенностью, сохранностью структуры внеклеточного матрикса и высокой прозрачностью лентикулярного материала.

Впервые проведен сравнительный анализ протоколов криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала с использованием 0,1% SDS и 1.5M NaCl с нуклеазами в таких криопротекторах, как ДМСО, Криодерм и глицерин, который показал, что наилучшим протоколом, обеспечивающим высокие показатели прозрачности материала, без грубого нарушения ультраструктуры фибрилл коллагеновых волокон является протокол хранения в ДМСО с предварительной децеллюляризацией в 1.5M NaCl с нуклеазами.

Впервые показано, что использование дисперсного вискоэластика в качестве дегидратирующей среды для лентикулярного материала после его децеллюляризации и криоконсервации приводит к возвращению его исходных параметров толщины ( $p < 0.05$ ), в интервале от 30 минут до 60 минут.

Впервые показано, что при совместном культивировании кератоцитов с децеллюляризованным лентикулярным материалом после криоконсервации в течение максимального срока наблюдения 9 суток получена высокая биосовместимость и сохранение пролиферативной активности культуры кератоцитов.

Впервые при помощи методов математического моделирования разработана формула, показывающая связь толщины лентикулярного материала и его диаметра для ожидаемой коррекции гиперметропии после имплантации лентикулярного материала в строму роговицы, позволяет достигать целевой рефракции глаза.



Таким образом, полученные результаты и научные положения, выносимые на защиту, можно оценить как новые для современной офтальмологической и фундаментальной наук.

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

Диссертационное исследование Ли В.Г. носит прикладную направленность и представляет несомненную перспективу для дальнейших научных исследований в области тканевой инженерии роговичных тканей.

Разработанный протокол криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала с использованием 1.5M NaCl с нуклеазами в ДМСО обеспечивает высокую прозрачность образцов ( $89,44 \pm 2,68\%$  ( $89,52$  ( $87,99-91,18$ )), сохранение ультраструктуры коллагенового внеклеточного матрикса ( $2,45 \pm 0,36$  мкм) без грубого повреждения и токсического воздействия на окружающие ткани, что позволяет создать криобанк лентикулярной ткани.

На основании математического моделирования разработана формула, функционально связывающая толщину лентикулярного материала и его диаметра с рефракционным эффектом на роговице. Также проведены параметрические расчеты, показывающие влияние толщины образца на изменение величины рефракционного эффекта в диапазоне изменений кератометрии интактной роговицы от 40 дптр до 45 дптр, и диаметра образца от 6 мм до 7 мм. Разработана диаграмма для оценки возможной погрешности рефракционного эффекта при выборе образцов из банка хранения лентикулярного материала.

Для потенциального клинического использования образцов с целью коррекции гиперметропии целесообразно применять лентикулярный материал с меньшей диоптрийной силой, чем предполагаемая коррекция. Так, для коррекции гиперметропии +4 дптр, согласно разработанной диаграмме, потребуется образец толщиной от 56 мкм до 62 мкм, в зависимости от диаметра от 6,3 мм до 6,8 мм, что соответствует диоптрийной силе лентикулярного материала около 2,5 дптр, полученной при коррекции миопии методом СМАЙЛ.

## Оформление диссертации и оценка ее содержания

Диссертация построена в классическом стиле, изложена на 177 страницах машинописного текста и состоит из введения и 4 глав (включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты разработки протокола криоконсервации децеллюляризованного лентикулярного материала, математическое обоснование основных параметров лентикулярного материала и оценка эффективности коррекции гиперметропии при интрастромальной кератофакии в эксперименте *ex vivo*), заключения, выводов, списка литературы, включающего 205 источников, из них 30 отечественных и 175 зарубежных.

Во **введении** к диссертационной работе обоснованы актуальность, научная новизна, практическая значимость исследования, а также сформулированы цель и задачи работы, положения, выносимые на защиту, и приведена структура работы. **Обзор литературы** представлен в достаточном объеме, написан, как и вся диссертация, хорошим литературным языком и свидетельствует о глубоких и всесторонних знаниях проблем рефракционной хирургии и тканевой инженерии роговицы. Стиль изложения позволяет получить образное впечатление о современном состоянии темы настоящего диссертационного исследования. Приведены данные о разнонаправленном использовании роговичной лентикулы для стромальной кератофакии. Сообщается о современных возможностях технологий тканевой инженерии для роговичной ткани. Исходя из приведенных данных литературы, автор заключает, что имеется проблема, требующая разработки нового высокотехнологического метода криоконсервации децеллюляризованной роговичной лентикулы, а также возможность ее использования в кераторефракционной хирургии.

В главе **Материалы и методы** представлена подробная характеристика методов экспериментальных исследований, а также общая характеристика групп для роговичных лентикул, включенных в экспериментальных исследованиях *in vitro* и *ex vivo*, методология самого исследования, оценки

результатов выполненных методов исследований и их статистической обработки. Автором четко изложены основания для разделения роговичных линтикул по группам сравнения. Следует также отметить масштаб, проведенных фундаментальных исследований роговичных линтикул.

В **3-й главе** автор подробно описывает результаты проведенного сравнительного анализа для различных протоколов децеллюляризации линтикулы. Разработан протокол криоконсервации линтикулы (1.5MNaCl с нуклеазами в ДМСО), который может быть рекомендован для будущего их применения в клинике. Полученные результаты фундаментального этапа исследования позволили диссертанту перейти к следующему этапу работы – проведению серии экспериментов *ex vivo*.

В **4-ой главе** представлены результаты математического моделирования, на основании которого автор предоставляет механизм формирования рефракционного эффекта роговицы после имплантации линтикулы в ее строму. Устанавливает оптимальные параметры линтикулы для достижения коррекции гиперметропии при интрастромальной кератофакии, предлагает математическую формулу и диаграмму определения параметров линтикулы. В дальнейшем в эксперименте *ex vivo* на примере имплантации 10-ти линтикул в строму роговиц 10-ти кадаверных глаз человека была дана оценка анатомо-топографических изменений роговицы с учетом разработанной диаграммой для коррекции гиперметропии.

Каждый раздел главы заканчивается обсуждением полученных результатов, в котором приводится подробное описание. Обращает на себя внимание безупречная логичность и убеждающая обоснованность интерпретации результатов проведенных исследований.

В **заключении** подводятся итоги проведенных исследований, и объединяет все полученные в работе результаты, логично приводит к важным как с фундаментальной, так и с практической стороны выводам.

**Выводы** вполне логично вытекают из результатов диссертационной работы и в достаточной мере соответствуют цели и поставленным задачам проведенного научного исследования.



Диссертация написана без грамматических и стилистических неточностей, изложена хорошим, образным научным языком.

По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, включая 3 в журналах, рекомендуемых Высшей Аттестационной Комиссией (ВАК) Министерства образования и науки Российской Федерации (РФ) полностью отражают содержание диссертационной работы.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

### **Вопросы и замечания**

Все замечания были учтены автором в процессе рецензирования диссертационной работы. Принципиальных вопросов и замечаний по содержанию и изложению работы не имею.

### **Заключение**

Диссертационная работа Ли Валерия Герасимовича «Разработка и экспериментальное обоснование технологии децеллюляризации и криоконсервации роговичных лентикул для кераторефракционной хирургии» является самостоятельной завершенной научно-квалифицированной работой, содержащей качественно новое решение актуальной задачи офтальмологии, а именно создание принципиально новых криоконсервированных децеллюляризованных роговичных лентикул для рефракционной хирургии роговицы.

По актуальности темы, научной новизне, объему проведенных исследований и значимости полученных результатов диссертационная работа Ли Валерия Герасимовича полностью соответствует требованиям п. 9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.5. – Офтальмология и 3.1.14. – Трансплантология и

искусственные органы, а ее автор заслуживает присвоения искомой ученой степени.

**Официальный оппонент:**

Руководитель Центра биомедицинских технологий,  
заведующая кафедрой регенеративной медицины,  
гематологии, молекулярной цитогенетики с курсом  
педиатрии МБУ ИНО Федерального государственного  
бюджетного учреждения «Государственный научный центр  
Российской Федерации –Федеральный медицинский  
биофизический центр имени А.И. Бурназяна»  
доктор медицинских наук, доцент

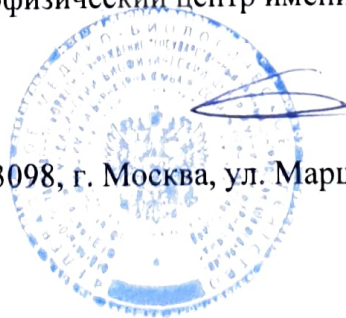
 Т.А. Астрелина

**Подпись Астрелиной Татьяны Алексеевны заверяю:**

Ученый секретарь – заведующий организационно методическим отделом  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
«Государственный научный центр Российской Федерации –  
Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна»,  
кандидат медицинских наук

Е.В. Голобородько

Фактический адрес: Россия, 123098, г. Москва, ул. Маршала Новикова, д. 23  
Телефон: +7 (499) 190-86-58  
Сайт в интернете: [fmbafmbc.ru](http://fmbafmbc.ru)  
E-mail: [t\\_astrelina@mail.ru](mailto:t_astrelina@mail.ru)



«25» марта 2022 г.