

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУ «НМИЦ ГБ  
им. Гельмгольца» Минздрава России,

доктор мед. наук, академик РАН

В. В. Нероев



2022

### **ОТЗЫВ ВЕДУЩЕГО УЧРЕЖДЕНИЯ**

о научно-практической значимости диссертационной работы

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 темы диссертации**

Диссертационная работа Ли В. Г. направлена на решение одной из важнейших проблем в офтальмологии – создание банка для хранения децеллюляризованных роговичных лентикул с целью дальнейшего их применения в кераторефракционной хирургии.

Хорошо известно, что после кераторефракционной операции СМАЙЛ, полученная роговичная лентикла извлекается из глаза пациента и в дальнейшем подвергается утилизации. Однако следует учитывать, что данная лентикла является частью стромы роговицы, в связи с чем она может рассматриваться как истинный трансплантат. Таким образом данная лентикла обладает широкими возможностями для ее будущей трансплантации в кераторефракционной хирургии. В настоящее время в мире существует острая проблема нехватки донорских тканей в глазных тканевых

банках. Использование роговичной лентикеры для лечения различных кератэктатических состояний роговицы, гиперметропии, пресбиопии и миопического астигматизма является крайне актуальным. Однако следует обратить внимание на то, что в аллогенной роговичной лентикере содержатся остаточные клеточные компоненты, которые могут вызвать реакции иммунологического отторжения ткани. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины, а именно методики децеллюляризации способны решить данную проблему. Кроме того, благодаря достижениям в криобиологии тканей современные технологии их криоконсервации позволяют сохранять роговичные ткани без значимого повреждения их коллагенового каркаса, как следствие, обеспечивают их высокую прозрачность.

В последние годы с популяризацией послойных кератопластических операций увеличилось число сообщений отечественных и зарубежных ученых о применении децеллюляризированной и криоконсервированной роговичной лентикеры для лечения кератоконуса, пресбиопии, гиперметропии и других патологических состояний роговицы.

Известно, что процедуры криоконсервации и децеллюляризации роговичных лентикер требуют соблюдения ряда условий для успешной их реализации. К таким условиям следует относить: проблему логистики роговичных лентикер из мед. учреждений до лаборатории, отсутствие специализированного оборудования, отсутствие обученных квалифицированных кадров, специфических расходных материалов. Самое важное, отсутствует стандартизированный протокол децеллюляризации роговичной лентикеры, также отсутствует протокол криоконсервации для децеллюляризированной роговичной лентикеры, обладающей низкой токсичностью и высокой прозрачностью, и позволяющей использовать данный роговичный материал для рефракционной хирургии.

В связи с этим разработка технологии криоконсервации децеллюляризированной роговичной лентикулы для кераторефракционной хирургии является актуальным и своевременным исследованием.

### **Связь с планом научных исследований**

Диссертация Ли В. Г. на тему: «Разработка и экспериментальное обоснование технологии децеллюляризации и криоконсервации роговичных лентикул для кераторефракционной хирургии» выполнена в соответствии с планами научно-исследовательских работ ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России. Работа соответствует специальностям 3.1.5. – Офтальмология, 3.1.14. – Трансплантология и искусственные органы.

### **Научная новизна исследования**

Проведенный в диссертационной работе сравнительный анализ протоколов децеллюляризации роговичной лентикулы показал, что протоколы децеллюляризации с использованием 1.5M NaCl с нуклеазами и 0,1% SDS не имеют статистически значимых отличий от нативных образцов ( $p > 0,05$ ), в аспекте воздействия на прозрачность. Гистологический и иммуногистохимический анализы показали полное отсутствие ядерных компонентов в децеллюляризованных лентикулах. Сканирующая электронная микроскопия не показала значительного изменения состояния фибрилл коллагеновых волокон. Анализ содержания остаточной ДНК показал низкое содержание ДНК в роговичной ткани и статистически значимые отличия от нативных образцов ( $p < 0,05$ ). Кроме того, разработанный оригинальный способ транспортировки нативной роговичной лентикулы в дисперсном вискоэластике, позволяет устранить неспецифический отек ткани и получать высокие показатели ее прозрачности ( $89,35 \pm 2,38\%$ ) при спектрофотометрическом исследовании.

Впервые продемонстрирован анализ протоколов криоконсервации децеллюляризированной роговичной лентикулы с использованием 0,1% SDS и 1.5M NaCl с нуклеазами в трех криопротекторах: ДМСО, Криодерм и

глицерин с помощью методов спектрофотометрии и сканирующей электронной микроскопии. Результаты анализа показали, что наилучшим протоколом хранения децеллюляризированной лентикулы является протокол децеллюляризации с использованием в 1.5М NaCl с нуклеазами в криопротекторе – ДМСО. Данный протокол хранения обеспечивает высокую прозрачность материала, не имеющего статистически значимых отличий от нативных образцов ( $p > 0,05$ ). Сканирующая электронная микроскопия этого протокола хранения также не выявила статистически значимых отличий от нативных образцов. Автором впервые проведено изучение цитотоксичности криоконсервированной лентикулы (1.5М NaCl с нуклеазами в ДМСО) в присутствии кератоцитов, являющейся важным аспектом для использования в офтальмохирургии. Также впервые показана дегидратирующая способность дисперсного вискоэластика возвращать толщину набухшей роговичной лентикулы к исходной толщине, что также имеет большое значение для использования данной ткани в рефракционной хирургии.

Впервые разработаны математическая формула и диаграмма, учитывающие основные параметры роговичной лентикулы необходимые для коррекции гиперметропии. Достижение целевой рефракции после имплантации лентикулы в строму роговицы в соответствии с формулой и диаграммой было продемонстрировано в эксперименте на кадаверных глазах.

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

В диссертационной работе Ли В. Г. сообщаются фундаментальные и экспериментальные данные, подтверждающие способность криозамороженной лентикулы изменять кривизну передней поверхности для достижения коррекции целевой рефракции кадаверного глаза в соответствии с разработанными математической формулой и диаграммой. Разработанная технология криоконсервации децеллюляризированной лентикулы позволяет получать образцы с высокими показателями прозрачности, без значимого изменения ультраструктуры коллагена внеклеточного матрикса. Кроме того,

разработанный протокол хранения децеллюляризированной роговичной ткани не оказывает значительного цитотоксического воздействия на клетки роговицы.

Фундаментальный характер исследования прозрачности и состояния ультраструктуры внеклеточного матрикса криозамороженной децеллюляризированной роговичной лентикулы представляет особую значимость для офтальмологии и фундаментальной медицины в целом, поскольку подобные исследования не представлены в литературе.

Уточненные основные параметры роговичной лентикулы необходимые для коррекции гиперметропии позволяют достигать целевой рефракции с высокой точностью в эксперименте *ex vivo*. Важным для практического использования является строгое соблюдение стерильных условий на всех этапах работы с роговичной лентикулой, что обеспечивает безопасность ее использования в клинической практике офтальмохирургов.

**Достоверность выводов и положений, выносимых на защиту,  
личный вклад автора**

Диссертационная работа Ли В. Г. выполнена с использованием современных объективных методов исследования, включающих спектрофотометрический метод, гистологический и иммуногистохимический анализы, сканирующую электронную микроскопию, анализ содержания остаточной ДНК, тест «Live and Dead», метод «ДНК-комет», МТТ– тест, компьютерную кератотопографию, оптическую когерентную томографию.

Выводы основываются на достаточном объеме фактического материала, корректных методах статистической обработки данных. Таким образом, достоверность выводов не вызывает сомнений. Практические рекомендации сформулированы четко и подкреплены результатами проведенного исследования. Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основные положения диссертации.

## **Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы в практике**

Проведенная Ли В. Г. экспериментальная работа показала способность применения криозамороженной децеллюляризированной роговичной лентикулы для коррекции гиперметропии в эксперименте *ex vivo*. Создание банка децеллюляризированных роговичных лентикул позволит в дальнейшем использовать данный материал для лечения множества других патологических состояний роговицы.

Применение дисперсного вискоэластика в качестве транспортировочной среды для роговичной лентикулы позволяет упростить процедуру спектрофотометрического анализа. Соблюдение условий стерильности на всех этапах подготовки лентикулы исключает ее дополнительную обработку раствором антибиотика-антимикотика. Для использования роговичной лентикулы в клинике с целью коррекции гиперметропии наиболее оптимальным является использование лентикулы с меньшей диоптрийной силой, чем ожидаемая коррекция.

Считаем, что для подтверждения эффективности и безопасности разработанной диссертантом технологии необходимо проведение дальнейших дополнительных исследований сначала в эксперименте на модели животных, а затем в клинической практике.

### **Личный вклад автора**

Экспериментальная часть *in vitro* выполнялась на базе Центра Фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России, г. Москва. ДНК–анализ проводился в лаборатории геномной инженерии на базе Московского физико-технического института (национального исследовательского университета). Работа с донорским материалом проводилась на базе Глазного тканевого банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России, г. Москва.

Математическое моделирование и экспериментальная часть исследования ex vivo выполнялись на базе вычислительного центра и в отделе лазерной рефракционной хирургии ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, г. Москва. Автором была сформирована база данных, проведена статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

Сформулированные в диссертации выводы обоснованы результатами проведенного исследования. Автореферат полностью отражает основные положения диссертации.

### **Апробация работы и публикации**

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, из них 3 статьи – в журналах, рекомендуемых ВАК РФ.

Материалы работы доложены и обсуждены на онлайн-конференции «Роговица V. Новые достижения и перспективы» (Москва, 19 февраля 2021 г.), на Республиканской научно-практической конференции «Новые технологии в офтальмологии 2021» (Казань, 17 апреля 2021 г.), на Всероссийской научно-практической онлайн-конференции с международным участием «SOCHI-CORNEA 2021» (Сочи, 24 апреля 2021 г.), на Всероссийской научно-практической онлайн-конференции с международным участием Федоровские чтения / Конференция молодых учёных (Москва, 7 июня 2021 г.), на еженедельной научно-клинической конференции ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России (Москва, 11 июня 2021 г.).

### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Ли Валерия Герасимовича «Разработка и экспериментальное обоснование технологии децеллюляризации и криоконсервации роговичных линтикул для кераторефракционной хирургии» является завершённым научно-квалификационным трудом, выполненным на высоком научном и методологическом уровне. В работе представлено новое решение актуальной

задачи офтальмологии, а именно: разработана технология криоконсервации децеллюляризированной роговичной линтикулы с последующей ее имплантацией в строму роговицы в эксперименте, являющаяся перспективной для дальнейших экспериментальных исследований с целью внедрения в клиническую практику для лечения различных патологических состояний роговицы.

Диссертационная работа Ли В. Г. 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.

Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на заседании Экспертной комиссии Ученого совета

Протокол № 3 от «23» 03 2022 г.

Ведущий научный сотрудник  
отдела травматологии и реконструктивной хирургии  
ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца»  
Минздрава РФ  
доктор медицинских наук, доцент

О. Г. Оганесян

«Заверяю»  
Ученый секретарь  
ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца»  
Минздрава РФ  
кандидат медицинских наук



Е. Н. Орлова

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Юридический и почтовый адрес: 105062, Москва, ул. Садовая-Черногрязская 14/19  
Тел.: +7 (495) 625-87-73  
Сайт: [helmholtzeyeinstitute.ru](http://helmholtzeyeinstitute.ru)  
E-mail: [kanc@igb.ru](mailto:kanc@igb.ru)