

ВІДГУК

на дисертаційну роботу Григор'єва Віталія Вікторовича «Використання біологічної активності аутофібрину при хірургічному лікуванні переломів» на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

Актуальність обраної теми дисертації.

На сучасному етапі розвитку травматології ортопедії частота оперативного лікування переломів кісток постійно зростає. Індустрія пропонує сучасні імпланти, що дозволяють надійно фіксувати кісткові уламки та створювати сприятливі механічні умови для їх зрощення. Але, незважаючи на досконалість фіксаторів та хірургічних технік остеосинтезу, частота незрощень кісток не зменшується. Особливо актуальна дана проблема в Україні, де велика кількість операцій виконується за розширеними показами та з порушенням хірургічної техніки.

Саме тому увага прикута до «біологічного напрямку» в ортопедії. Використання клітинних технологій, факторів росту, біологічних матриксів є перспективою сучасної науки. Особливо актуально це і тому, що кісткова тканина - одна з небагатьох, що здатна до реституції, тобто повного відновлення структури та форми після ушкодження.

Потенціал тромбоцитарних факторів росту не викликає сумніву, оскільки доведена їх роль в процесах репарації тканин. Останні десятиріччя дуже популярною є «збагачена тромбоцитами плазма», що широко використовується в медицині, в тому числі в кістковій хірургії. Але виникає питання – як спрацьовують та як реалізують свої потенції тромбоцитарні цитокіни? Як організована їх дія в просторі та часі? На території якого субстрату (матриці) вони реалізують свій вплив? Оскільки природнім матриксом для них є фібринова сітка, що утворюється при коагуляції крові, очевидно, що «збагачений тромбоцитами фібрин» може бути ідеальним середовищем для реалізації їх потенцій.

При аналізі наукових джерел (PubMed) за пошуковим запитом «Platelet Rich Fibrin» знайдено велику кількість робіт по використанню фібринового матриксу, особливо в щелепно-лицевій хірургії та імплантології. В них доведена ефективність фібрину для відновлення кісткової маси. В той же час, роботи по його використанню в кістковій хірургії є поодинокими. Виникає логічне питання – чому, зважаючи на доведену ефективність використання збагаченого тромбоцитами фібринового згустку в стоматології він не використовується в травматології та ортопедії.

Важливими питаннями залишаються: який метод приготування аутофібрину кращий, як отримати достатню кількість матеріалу, яка структура новоутвореної фібринової сітки, чи дійсно в матриці містяться цитокіни, яка динаміка їх виділення в просторі та часі, які умови необхідні для прояву їх стимулюючого ефекту та чи може даний матеріал покращити результати лікування переломів кісток?

Вивчення матеріалів дисертаційної роботи та опублікованих дисертантом праць дозволяє стверджувати успішність наукового розв'язання актуальної проблеми сучасної травматології-ортопедії та віднести це наукове дослідження до окресленого вище напрямку.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами.

Дисертаційна робота відповідає плану науково-дослідних робіт кафедри травматології та ортопедії Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова Міністерства охорони здоров'я України «Комплексне відновне лікування пацієнтів з травмами та захворюваннями опорно-рухового апарату», державна реєстрація № 020411008505. Автором обстежено хворих із переломами кісток, виконано хірургічні втручання з використання аутофібрину, проаналізовано результати лікування пацієнтів запропонованими методиками.

Ступінь обґрунтованості та достовірності основних положень, висновків і рекомендацій, які сформульовані в дисертації.

У клінічній частині роботи проаналізовано результати обстеження та лікування 60 хворих з переломами кісток, у двох групах. Перша група – 27

хворих зі свіжими переломами кісток. Локалізація перелому та його вид значно відрізнялись. Однорідність групи визначалась за наявністю показів до аутофібринопластики – випадки з потенційною небезпекою незрощення. Друга група хворих – 33 пацієнта з незрощеними переломами, хибними суглобами, рефрактурами, що потребували оперативного лікування. Локалізація та характер незрощеного перелому також були різними. Ефективність методу оцінювали рентгенологічно та клінічно - за наявністю кісткового регенерату в місці укладки аутофібринових згустків, за рентгенологічними та клінічними ознаками зрощення уламків. Всі пацієнти проходили лікування в КЗ «Третя Черкаська міська лікарня швидкої медичної допомоги» та в ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. М.І.Ситенка НАМН України». Автор дисертації брав участь у проведенні хірургічних втручань у всіх хворих.

Для приготування фібринових згустків було використано лабораторну центрифугу СМ-6М на 4 пробірки об'ємом 50 мл (виробництва фірми «ELMI»ISO 9001:2008); пластикові пробірки об'ємом 50 мл типу Falcon «Sarstedt»; пластикові гранули діаметром 2–3 мм «Sarstedt»; стерильний 10 % розчин CaCl_2 в ампулах об'ємом 5 мл; одноразові пластикові шприци Medicare 50 мл з голкою 18G.

Дослідження фібрину, отриманого шляхом центрифугування *in-vitro*, та тканин прилеглих до перелому, на вміст у них біологічно активних факторів (VEGF, TGF β) проводилось в лабораторії Черкаського обласного онкологічного диспансеру, де виготовляли гістологічні та імуногістохімічні препарати. Біоптати обробляли відповідно до загальноприйнятих методик гістологічного дослідження з використанням гістопроектора «Microm CP-120» та заливали в парафін. У подальшому дані препарати вивчали та аналізували під світловим мікроскопом «Olympus BX-63» (Olympus Corp. Tokyo, Japan) та фотографували цифровою камерою DP7 із використанням прикладної програми «CellSensDimension» ver.510 (Olympus Soft Imaging Solution; Gmb H, 2013). Результати оцінювались за якісними показниками (інтенсивність кольору забарвлення) та є достовірними. Гістологічні дослідження виконувались за

участі лабораторії сполучної тканини ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України», яка має відповідні ресурси та умови.

Методи приготування аутофібринових згустків відрізнялись за джерелом отримання крові, наявністю антикоагулянтів та активаторів згортання. Час та швидкість центрифугування були стандартними. Для вимірювання об'єму аутофібрину використовувались градуйовані пробірки 50мл з прозорою стінкою, що дозволяло чітко виміряти об'єм утвореного згустку.

Автором адекватно були використані сучасні клінічні, лабораторні та променеві методи дослідження. Сучасна статистична обробка результатів дає можливість зробити висновок про достовірність результатів роботи. Враховуючи наявність достатньої кількості клінічних і експериментальних спостережень, використання загальноновизнаних точних методик вимірювання, можливо стверджувати, що авторів повністю вдалося теоретично обґрунтувати та сформулювати основні положення, висновки і рекомендації дисертаційної роботи.

Новизна наукових положень, що сформульовані у дисертації, їх практичне значення

Наукова новизна полягає в розробці методу приготування аутофібринових згустків в кількості, достатній для використання в хірургії великих кісток. Успішно апробовані різні джерела крові, як субстрату для отримання згустків. Доведена можливість їх приготування з крові, взятої в достатній кількості (до 400мл) задовго до операції (24 години). При цьому структура фібринової сітки є ідентичною натуральній та мало відрізняється при різних методах приготування.

Імуногістохімічним методом вивчено експресію ключових факторів росту тромбоцитів (VEGF, TGF) в навколівідламкових тканинах, міжфрагментарному кров'яному згустку та аутофібриновому згустку, приготованому *in vitro*. Дослідження проводились на різних етапах утворення згустку, що дало можливість дослідити експресію цитокінів в просторі та часі. Розуміння - які

фактори росту, де і коли починають «працювати» - дає змогу уявити процес загоєння перелому на тканинному рівні.

Гістологічно та імуногістохімічно доведено - структура фібринової сітки згустків, отриманих *in vitro* та *in vivo* є ідентичною, вміст факторів росту та динаміка їх виділення також. Це свідчить, що аутофібрин, приготований за розробленою методою має біологічні властивості природнього фібрин-кров'яного згустку.

Вперше на достатній кількості хворих доведено, що аутофібриновий згусток, отриманий за розробленою методикою та поміщений в сприятливі умови є субстратом, на основі якого відбувається утворення кісткового регенерату. Чітко описані умови, що виконувались під час операції для того, щоб новоутворений кістковий регенерат сприяв зрощенню уламків. Проаналізовані випадки, коли зрощення уламків не відбулось та вказано на ключову роль механічних стимулів в цьому процесі.

Доведено, що у хворих з численними травмами, важким станом та гемодилуцією внаслідок медикаментозного лікування здатність до утворення фібринового згустку суттєво зменшена.

З практичної точки зору, автором було розроблено методику отримання аутофібринових згустків. Для отримання достатньої кількості матеріалу запропоновані різні джерела отримання крові – периферична вена, центральна вена, консервована кров, пунктат з крила клубової кістки, що дозволяє застосувати методику при лікуванні переломів довгих кісток та кісткових дефектів.

Результати, отримані в результаті клінічних досліджень, довели ефективність застосування аутофібринопластики при лікуванні складних переломів та при лікуванні порушень репаративного остеогенезу. Було аргументовано доведено, що аутофібрин можна використовувати, як біологічний матеріал, що стимулює ангіогенез та остеогенез в місці його імплантації.

Вивчення фібриноутворення у пацієнтів з різною тяжкістю травми доводить, що пацієнти у важкому стані мають значно нижчий потенціал до утворення фібринових згустків, що може негативно впливати на результат лікування переломів.

Структура і зміст дисертації, дотриманість діючих вимог щодо оформлення дисертації та автореферату.

Дисертація викладена українською мовою на 166 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, аналізу літератури, розділу «Матеріал і методи», 4 розділів власних досліджень, висновків, додатків, 143 використаних джерела літератури (41 – кирилицею та 102 – латиницею). Дисертація містить 41 рисунок, 14 таблиць.

Метою дослідження є удосконалення хірургічного лікування переломів кінцівок шляхом обґрунтування та розроблення методики стимуляції кісткової регенерації аутофібрином. Для досягнення даної мети автором були поставлені 5 завдань, досконале виконання яких дозволило автору роботи отримати достовірні науково обґрунтовані результати і покращити результати лікування пацієнтів з переломами довгих кісток кінцівок.

Завершують роботу чітко сформульовані висновки, що повністю відповідні до завдань дисертаційного дослідження та відображають отримані позитивні наукові та клінічні результати.

В авторефераті автор повністю розкриває основні положення дисертаційної роботи. Слід зазначити, що сама дисертація та автореферат оформлені у відповідності до чинних вимог виконання кандидатських дисертацій.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих роботах.

За темою дисертації опубліковано 7 наукових праць, із них 5 оригінальних статей у наукових фахових виданнях (1 в журналі, що входить до нормометричної бази Web of Science), 2 роботи в матеріалах з'їздів. Зроблено 7 наукових доповідей на різних ортопедо-травматологічних кворумах, в тому числі і за кордоном.

Зауваження та запитання

За структурою та змістом методологічно вірно викладеного матеріалу дане дисертаційне дослідження у повній мірі відповідає чинним вимогам МОН України до дисертаційних робіт.

Після ознайомлення з дисертаційною роботою Григор'єва В.В. виникли деякі зауваження та запитання.

У дисертації зустрічаються граматичні помилки та несуттєві стилістичні погрішності.

Запитання:

1. Чи відігравав певну роль у способі використання та отриманні результатів запропонованої методики аутофібринопластики метод остеосинтезу при лікуванні первинної травми у гострому періоді після травми, у пацієнтів першої групи?

2. Яка супутня патологія була у пацієнтів обох клінічних груп? Яким чином дана патологія впливала на проведення досліджень?

3. Можливо було б доцільно провести порівняння результатів лікування пацієнтів з діафізарними переломами у групах з використанням аутофібринопластики та без неї?

4. На скільки об'єктивним або суб'єктивним методом оцінки наявності факторів росту VEGF і TGF у клітинах або позаклітинному матриксі при гістологічних, імуногістохімічних дослідженнях може бути інтенсивність коричневого забарвлення у досліджуваних препаратах?

Зазначені зауваження та запитання не є принциповими, тому вони не знижують наукової та практичної цінності дисертаційної роботи.

Рекомендації з використання результатів дисертації в практиці.

Отримані автором результати дисертаційного дослідження дають можливість зробити висновок, що стимуляцію кісткоутворення можна досягти за допомогою біологічно активних тромбоцитарних факторів, які зв'язані з фібрином. Розроблена методика стимуляції аутофібрином процесу регенерації кістки, яка передбачає, що отримані шляхом центрифугування фібринові

згустки придатні для заповнення дефектів кістки в зоні перелому, дозволила отримати у хворих із діафізарним переломом зрощення відламків більш ніж у 90 % випадків. А фібринові згустки можуть бути використані в разі накісткового, інтрамедулярного блокованого та позавогнищевого остеосинтезу апаратами зовнішньої фіксації за умов відкритої репозиції відламків. Як стимулятори кісткоутворення вони можуть бути використані і в разі свіжих переломів, так і в разі переломів, що не зрослися.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Григор'єва Віталія Вікторовича «Використання біологічної активності аутофібрину при хірургічному лікуванні переломів» виконана на актуальну тему, є самостійно виконаним і завершеним науковим дослідженням, в якому отримано нові науково обгрунтовані результати, що вирішують важливе наукове завдання – а саме удосконалення хірургічного лікування переломів кісток кінцівок.

Отримані результати дослідження науково обгрунтовані і висвітлені в опублікованих наукових роботах. Зміст автореферату відображає основні положення роботи.

Дисертаційна робота за актуальністю, методичним рівнем і обсягом досліджень, науковою новизною, теоретичним і практичним значенням отриманих результатів повністю відповідає вимогам п. 11 "Порядку присудження ... ", а дисертант гідний присудження наукового ступеня кандидата медичних наук.

Офіційний опонент

Головний лікар Державної установи "Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І.Ситенка Національної академії медичних наук України", заслужений лікар України, доктор медичних наук, професор



О.О.Вирва

Григор'єв Віталій Вікторович
ради 12.02.21р