

ОТЗЫВ

официального оппонента

заслуженного деятеля науки Российской Федерации, доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой урологии и репродуктивного здоровья человека (с курсом детской урологии – андрологии) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации **Когана Михаила Иосифовича** о диссертации Бутнару Дениса Викторовича на тему: «Место тканевой инженерии в хирургическом лечении стриктур уретры у мужчин», представленной на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.13. Урология и андрология.

Актуальность темы проведённого исследования.

Актуальность проблемы стриктур уретры обусловлена многообразием методик лечения, подчас их неудовлетворительными результатами и социально-экономической значимостью этого заболевания. Частота ятрогенных стриктур уретры в настоящее время растёт ввиду широкого применения эндоскопических вмешательств, также в группе риска находятся пациенты с длительной катетеризацией мочевого пузыря.

Один из путей улучшения результативности хирургического лечения пациентов со стриктурой уретры – это персонализированный подход к выбору вида операции, что является одной из задач работы. Другой перспективный путь – разработка тканеинженерных решений, которые позволили бы создавать ткань с необходимыми характеристиками, замещающую суженный участок и препятствующую рецидиву рубцового процесса. Большинство работ на эту тему ограничиваются исследованиями на культурах клеток и не приводят экспериментальных данных о результатах предложенного подхода.

Также нерешённой остаётся проблема тактики в сложных случаях, в частности, при стриктурах уретры большой протяжённости, множественных стриктурах и рецидивах после предшествующего хирургического лечения.

Большинство из этих проблем подняты в данной диссертационной работе, что делает её актуальной.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Методология проведённых исследований соответствует поставленным задачам. В результатах собственных исследований автор пошагово приводит методологию формирования гибридной матрицы из децеллюляризированной стенки артерии и клеток буккального эпителия. Детальное описание процесса позволит в дальнейшем провести валидирующие исследования по этой тематике другим учёным.

Аналогично в клинической части диссертант приводит подробное описание проведённых вмешательств, что свидетельствует о глубоком знании темы и обоснованности суждений. Практический опыт состоит из более чем 1 тыс. непосредственно выполненных операций и дополнительно статистических данных ещё об 1 тыс. операций из зарубежного специализированного центра.

Автор корректно применяет статистические методы обработки данных и приводит результаты в соответствии с принципами доказательной медицины. Он проводит послеоперационный контроль за состоянием пациентов и приводит результаты лечения по всем необходимым параметрам. Таким образом, научные положения, выводы и рекомендации основываются на результатах работы, они отличаются высоким качеством и обоснованностью.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов.

Автор впервые суммировал результаты лечения больных стриктурой уретры в зависимости от модификации операции, типа стриктуры и анамнестических сведений, на основании чего он разработал рекомендации по персонализированному подходу к лечению таких пациентов. Впервые разработана методика создания многослойной тканеинженерной конструкции с применением клеточных сфероидов. Эта методика позволила создать матрицу для уретропластики, однако её потенциал не ограничивается только урологией. Автор впервые использовал различные искусственные графты в доклинических экспериментах и у 2 пациентов со стриктурой уретры в клиническом исследовании.

Достоверность материала подтверждается большой доклинической и клинической экспериментальной работой, а также статистической обработкой материала.

Структура и содержание диссертации.

Диссертация изложена на 281 листе машинописного текста, состоит из введения, 3 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы, включающего 32 отечественных и 204 иностранных источника. Работа содержит 12 таблиц, 159 рисунков.

Материалы и методы исследования

Диссертационная работа состоит из двух частей: (1) первая часть посвящена разработке подходов к тканевой инженерии при стриктурах уретры; (2) вторая – определению оптимального хирургического алгоритма при сужениях мочеиспускательного канала.

Первая часть работы выполнена в части выделения клеток, получения материала и его характеристики, формирования тканеинженерных конструкторов для уретропластики на базе Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), операции на животных – Центрального вивария ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), имплантация конструкторов на основе децеллюляризованной артерии и гибридной матрицы пациентам проводилась в рамках клинических исследований на базе УКБ№2 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Первичная культура была выделена из образцов материала слизистой ротовой полости, взятого во время плановых операций с информированного добровольного согласия пациентов (на базе Института урологии и репродуктивного здоровья человека, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова). Непосредственно после забора материала биоптаты в условиях операционного кабинета помещали в заранее подготовленные пробирки с раствором Хэнкса, содержащего антибиотики (гентамицин, пенициллин, стрептомицин) и антимикотик (флуконазол) для первичной деконтаминации образцов (2 смены по 5 минут). Транспортировку биоптатов в лабораторию осуществляли в пробирках объемом 50 мл со средой DMEM:F12 с добавлением гентамицина.

Монослойные культуры клеток буккального эпителия были получены с использованием эксплантационного подхода. Так, забранный материал после тщательной отмывки в стерильном растворе Хэнкса с добавлением флуконазола, гентамицина, пенициллина и стрептомицина измельчался с использованием скальпеля и/или ножниц, помещался на поверхность чашек Петри диаметром 35 мм и покрывался небольшим количеством питательной среды для первичной адгезии к поверхности.

Культивирование клеток буккального эпителия осуществляли с использованием полной ростовой среды следующего состава: DMEM:F12 с добавлением глутамина (Биолот, Россия), гентамицина (50мкг/мл; ПанЭко, Россия), инсулина-трансферрина-селенита (1:100; Биолот, Россия), эпидермального фактора роста (20нг/мл; EGF; ProSpec, Израиль) и эмбриональной телячьей сыворотки (10%; HyClone, США), - в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) (Zurina I. et al., 2018). Смену среды и визуальный контроль

осуществляли 1 раз в 2-3 суток с использованием инвертированного микроскопа Primovert (Carl Zeiss, Германия).

Для установления фенотипа клеток использовали маркеры клеточной адгезии CD44, CD56 и CD326 и маркеры, характерные для ММСК: CD14, CD34, CD45, CD73, CD90 и CD105. Предварительно готовили суспензию клеток путем обработки монослойной культуры смесью трипсина и версена (1:1) и дальнейшего центрифугирования в течение 7 мин при 400g. К полученным образцам клеточной суспензии добавляли антитела, конъюгированные с флуоресцеина изотиоцианатом (FITC, fluorescein isothiocyanate), фикоэритрином (PE, phycoerythrin) и аллофикоцианином (APC – allophycocyanin), и инкубировали в темном месте в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем клетки вновь центрифугировали и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере с добавлением 1% эмбриональной телячьей сыворотки. Анализ был проведен с помощью проточного цитофлуориметра Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, Inc, США).

В ходе данного этапа исследования разработана концепция тканеинженерной конструкции, ее изучение *in vitro*, апробация *in vivo* на модели крыс / кроликов и использование у пациентов.

Вторая часть исследования представляет собой когортное ретроспективно-проспективное многоцентровое клиническое исследование. Когорты были сформированы на базе УКБ№2 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) – 1019 пациентов; на базе Тосканского хирургического центра (Ареццо, Италия) – 1242 пациента, а также на базе Центра реконструктивной уретральной хирургии (Ареццо, Италия) – 136 пациентов (в рамках договора о научно-клиническом сотрудничестве). В исследование включались пациенты со стриктурами уретры, которым выполнялось открытое или эндоскопическое пособие по поводу сужения мочеиспускательного канала. Критерием невключения являлись пациенты, для которых единственным методом лечения было бужирование уретры, меатотомия и трансуретральная резекция шейки мочевого пузыря и отказ от подписания информированного согласия. Послеоперационное обследование проводилось через 1, 3 и 6 месяцев в течение первого года после оперативного пособия, а затем ежегодно. Если пациент не являлся на послеоперационное обследование – это служило критерием для исключения его из исследования.

Первичной конечной точкой данного исследования являлась оценка эффективности различных видов лечения пациентов со стриктурами уретры. Перед оперативным лечением проводилось обследование пациентов (стандартное клиническое обследование, урофлоуметрия, ретроградная и микционная цистоуретрография, микроскопическое и

бактериологическое исследование 3 порции мочи; оценка объёма остаточной мочи); дополнительно выполнялись микционная ультразвуковая цистоуретроскопия (при невозможности выполнения микционной цистоуретрографии), ультразвуковое исследование спонгиозного тела (при сложных и рецидивных стриктурах уретры), эндоскопическое исследование мочеиспускательного канала (при сложных и рецидивных стриктурах уретры).

Принятие решения о выборе метода лечения основывалось на особенностях стриктуры уретры (локализация, протяжённость, количество, наличие предшествовавшего лечения, осложнения стриктурной болезни уретры, этиология), показателях урофлоуметрии, а также на статусе пациента.

Вторая часть исследования позволила сформировать алгоритм выбора оптимального хирургического пособия при стриктурах различной локализации, протяжённости и этиологии.

С целью восстановления просвета мочеиспускательного канала при стриктурах было предложено и испытано два дизайна биоэквивалента уретры: на основе децеллюляризованной артерии, заселенной суспензией клеток буккального эпителия, и гибридной матрицы, заселенной сфероидами из клеток буккального эпителия.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов.

Результаты работы при использовании на этапе планирования лечения позволяют повысить эффективность лечения за счёт обоснованного выбора тактики лечения, что представляет большую практическую значимость и отвечает задачам перехода к персонализированному здравоохранению.

Автор приводит подробное описание технологии работы с искусственными матрицами и клетками, что будет полезно не только для урологов, но и для широкого круга специалистов в области биоинженерии и молекулярной биологии.

Используемая автором методология исследования может быть взята за основу будущих работ по созданию и изучению новых матриц для уретропластики, что несёт несомненную значимость для науки.

Всё перечисленное позволит повысить эффективность лечения больных стриктурой уретры, что имеет как научно-практическое, так и социально-экономическое значение.

Полнота опубликования основных результатов диссертации и соответствие содержания автореферата основным идеям и выводам.

Результаты диссертационного исследования отражены в 41 публикации, 31- из которых являются научными статьями, опубликованными в журналах, включённых в перечень ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора наук. Научная новизна работы подтверждается 2 патентами на изобретение РФ. Основные положения диссертации доложены на многочисленных научных формах, конгрессах и научно-практических конференциях в России и за рубежом.

Автореферат соответствует основным положениям представленной диссертации и в полной мере отражает ее содержание. Диссертация и автореферат оформлены в соответствии с существующим ГОСТом Р 7.0.11-2011.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации.

Диссертация включает в себя обзор литературных данных и собственные исследования различных аспектов, связанных с проблемой стриктуры уретры и её хирургического лечения. Авторы провёл большую исследовательскую работу, описанную в 3 главах результатов собственного исследования. Они включают создание биоинженерной конструкции из культуры клеток и подлежащей матрицы, оценку биосовместимости и физических свойств полученного материала, моделирование заместительной уретропластики с применением данного скаффолда при операции у лабораторных животных. Далее проведено клиническое исследование описанного материала у пациентов со стриктурой уретры. Кроме того, анализируя результаты существующих методик, автор создал алгоритм выбора лечения.

Выводы и практические рекомендации сформулированы на основании результатов собственного исследования. Выводы соответствуют поставленным задачам и цели исследования. Диссертация является завершённым научным трудом. Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению работы нет.

Заключение.

Диссертационная работа Бутнару Дениса Викторовича, представленная на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.13. – Урология и андрология, является самостоятельной и законченной научно-квалификационной работой. В диссертации приводится решение актуальной научной проблемы —улучшения результатов лечения пациентов со стриктурой уретры. Результаты работы вносят существенный вклад в развитие урологии и важны для практического здравоохранения, что соответствует требованиям пунктов 9 -14 «Положение о

присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013г., а её автор заслуживает присуждения учёной степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.13. – Урология и андрология.

Заведующий кафедрой урологии и репродуктивного
здоровья человека (с курсом детской
урологии-андрологии) федерального
государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Ростовский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,

засл. деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор
(3.1.13 Урология и андрология)



Коган Михаил Иосифович

« 18 » 09 2023г.

Подпись М.И. Когана заверяю:

Ученый секретарь ученого совета
ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России
д. м. н., профессор



Сапронова Наталия Германовна

Адрес: 344022, Российская Федерация, Ростовская область, г. Ростов-на-Дону, переулок
Нахичеванский, 29. Телефон: +7(863) 250-42-00 E-mail: okt@rostgmu.ru

