

## **ОТЗЫВ**

### **официального оппонента**

доктора медицинских наук, доцента, заведующего кафедрой урологии и андрологии лечебного факультета федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации **Котова Сергея Владиславовича** о диссертации Бутнару Дениса Викторовича «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.**

Диссертация Д.В. Бутнару посвящена изучению такого сложного заболевания, как стриктуры уретры. Хотя данное заболевание не сказывается на продолжительности жизни пациентов, оно существенно влияет на качество жизни и трудоспособность, социальную активность. Нередко существующие методики лечения оказываются недостаточно эффективными или приводят к рецидиву заболевания. Более того, каждый вид хирургии несёт свой спектр потенциальных рисков и осложнений, среди которых могут быть проблемы с эрекцией, эякуляцией и т.д. Всё это должно учитывать при индивидуальном подходе к пациентам.

Действующие клинические рекомендации регламентируют лишь выбор между основными видами хирургических вмешательств при данной нозологии, однако, существует большое разнообразие методик и хирургических доступов в пределах каждого типа. Кроме того, для заместительной увеличивающей уретропластики могут применяться совершенно различные ткани. Детальной доказательной базы по персонализированному выбору оптимального подхода до сих пор не было разработано, и подчас многие хирурги принимают решение о том или ином виде операции исключительно основываясь на собственном опыте.

Таким образом, поднятая тема и поставленные задачи являются актуальными медицинскими проблемами, требующими изучения.

### **Структура и содержание диссертации.**

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

## **Материалы и методы исследования**

Данная диссертационная работа содержит две части, которые посвящены различным аспектам лечения стриктур уретры и выбору оптимальной методики хирургического вмешательства при сужении мочеиспускательного канала. В первой части работы рассматриваются различные подходы тканевой инженерии для лечения стриктур уретры, включая использование аутогенных и аллогенных трансплантатов, а также биоматериалов на основе гидрогелей и коллагена. Во второй части работы описывается выбор оптимального хирургического алгоритма при сужении мочеиспускательного канала, включая методы реконструкции, пластику и протезирование.

Исследования проводились на базе Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) в части выделения клеток, получения и характеристики материала; Центрального вивария ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) в части операций на животных; 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).

Выделение первичной культуры 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. 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.

Для получения монослойных культур клеток буккального эпителия использовался эксплантационный подход. Этот метод позволяет получить клетки в однородном состоянии, что упрощает их культивирование и дальнейшее использование в различных экспериментальных моделях.

Для культивирования клеток буккального эпителия применяли полную ростовую среду: 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%; NuClone, США), - в стандартных условиях (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (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).

Фенотип клеток устанавливался с использованием маркеров клеточной адгезии CD44, CD56 и CD326 и маркеры, характерные для ММСК: CD14, CD34, CD45, CD73, CD90 и CD105. Суспензию клеток готовили 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. Следующим этапом клетки вновь центрифугировали и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере с



добавлением 1% эмбриональной телячьей сыворотки. Для анализа был использован проточный цитофлуориметр Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, Inc, США).

На данном этапе исследования была разработана концепция тканеинженерной конструкции, которая изучается *in vitro*, то есть вне организма. Затем она была протестирована *in vivo* на моделях крыс и кроликов.

Вторая часть исследования - когортное ретроспективно-проспективное многоцентровое клиническое исследование. Формирование когорт проходило 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 были включены пациенты со стриктурами уретры, которым выполнялось открытое или эндоскопическое пособие по поводу сужения мочеиспускательного канала. Критерием невключения выступили 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 с интервалом в 1, 3 и 6 месяцев в течение первого года после оперативного пособия, а затем ежегодно. Неявка пациента на послеоперационное обследование служила критерием для исключения его из исследования.

В данной диссертации первичной конечной точкой является оценка эффективности различных видов лечения пациентов со стриктурами уретры. Перед оперативным лечением проводилось обследование пациентов включающее в себя стандартное клиническое обследование, урофлоуметрия, ретроградная и микционная цистоуретрография, микроскопическое и бактериологическое исследование 3 порции мочи; оценка объема 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, показателях урофлоуметрии, а также на статусе пациента.

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

В работе описывается два дизайна биоэквивалента уретры, которые были разработаны и испытаны для восстановления просвета мочеиспускательного канала при стриктурах. Первый дизайн основан на использовании децеллюляризованной артерии, которая была заселена суспензией клеток буккального эпителия. Второй дизайн представляет собой гибридную матрицу, которая была заселена сфероидными клетками буккального эпителия. Оба дизайна были протестированы на животных и показали положительные результаты в восстановлении функции мочеиспускательного канала.

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

Результаты диссертационной работы базируются на большом практическом опыте. Автор приводит сравнительный анализ 1019 уретропластик, выполненных по 6 различным методикам в Сеченовском Университете: группа №1 – буккальная уретропластика (с 4 подгруппами – дорсальная буккальная уретропластика, вентральная буккальная уретропластика, техника Asora, дорсальная буккальная уретропластика по Kulkarni и Barbagli), группа №2 – анастомотическая уретропластика (3 её подтипа - операция Хольцова, уретро-простатический анастомоз, анастомотическая уретропластика без пересечения спонгиозного тела), группа №3 – анастомотическая увеличивающая уретропластика, группа №4 – восстановление уретры с использованием реваскуляризованного свободного лоскута, группа №5 – промежностная уретротомия, группа №6 – оптическая уретротомия.

Помимо этого, автор также ссылается на зарубежный опыт и проводит анализ результатов лечения 1242 пациентов в Тосканском хирургическом центре. Размер приведённой выборки позволяет получить статистически достоверные данные. Экспериментальная часть работы включает исследование *in vitro*, на лабораторных животных и уретропластику искусственным графтом у 2 пациентов. Заключение автора подкреплены богатым иллюстративным материалом в виде интраоперационных фотографий, микропрепаратов и снимком уретрограмм.

Автор корректно применяет статистическим методы обработки данных и приводит результаты в соответствии с принципами доказательной медицины. Таким образом, научные положения, выводы и рекомендаций основываются на результатах работы и обоснованы.

## **Достоверность и новизна исследования, полученных результатов.**

Научная новизна исследования заключается в том, что автор впервые провёл сравнительный анализ всех распространённых методик лечения больных стриктурой уретры с учётом данных анамнеза и характеристик стриктуры, и на основании этого предложил единый алгоритм выбора метода операции. Впервые предложены и протестированы в доклинических экспериментах искусственные графты для уретропластики. Автор впервые применил искусственные матрицы для проведения уретропластики в клиническом исследовании.

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



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

Предложенный автором алгоритм выбора вида операции позволяет обоснованно подходить к выбору вида лечения у каждого конкретного пациента. Данный подход призван минимизировать частоту осложнений и увеличить эффективность лечения. Соответственно, в отдалённой перспективе он приведёт к уменьшению частоты повторных госпитализаций и операций, что положительно скажется на качестве жизни пациентов и снизит нагрузку на здравоохранение.

Технология создания биоэквивалент на основе гибридной матрицы и сфероидов из клеток буккального эпителия имеет большую теоретическую значимость. Возможные варианты применения таких графтов в самых различных областях медицины ещё предстоит изучить.

Автор демонстрирует, что при субтотальных и тотальных стриктурах уретры в эффективна одноэтапная аугментационную уретропластику с использованием слизистой щеки по Kulkarni-Barbagli – эффективностью 80%; либо заместительная уретропластика с применением кожно-фасциального лоскута крайней плоти и слизистой щеки – эффективностью 89%. Таким образом, в ряде случаев допустимо отказаться от 2-этапных операций.

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

### **Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации.**

Диссертация изложена на 281 листах машинописного текста, она содержит 12 таблиц и 159 рисунков. В списке литературы приведены 32 отечественных и 204 иностранных источника. Работа построена по классической схеме, она состоит из введения, 3 глав с результатами собственных исследований, выводов, практических рекомендаций. Отдельно хотелось бы отметить богатый иллюстративный материал, демонстрирующий пошаговое проведение операций, а также результаты послеоперационного обследования пациентов.

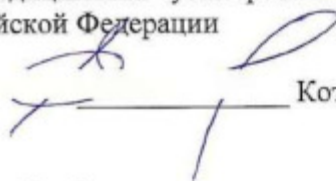
Работа сочетает в себе большую доклиническую часть (исследование на культурах клеток и животной модели), экспериментальную клиническую часть, а также сравнение существующих на практике методик на собственном опыте и разработку алгоритма выбора лечения. Приведённые выводы и практические рекомендации основаны на

результатах работы и несут существенное значение, они соответствуют поставленным задачам и вытекают из результатов 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 законченной научно-квалификационной работой, представляющей решение актуальной научной проблемы улучшения результатов лечения пациентов со стриктурой уретры на основании собственных исследований автора. Результаты работы вносят существенный вклад в развитие урологии и важны для практического здравоохранения, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 №842, а её автор заслуживает присуждения учёной степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.13. – Урология и андрология.

Официальный оппонент, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой урологии и андрологии лечебного факультета федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации



Котов Сергей Владиславович

*Подпись профессора Котова Сергея Владиславовича заверяю:*

« 14 » 09 \_\_\_\_\_ 2023 г.



ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России  
Адрес: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, дом 1.  
Телефон: + 7 (495) 952-43-45, + 7 (965) 439-48-39  
E-mail: [rsmu@rsmu.ru](mailto:rsmu@rsmu.ru)