

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора медицинских наук, профессора, руководителя Центра урологии и андрологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» **Кызласова Павла Сергеевича** 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.

Стриктура уретры представляет собой комплексную проблему, и решение её также должно быть комплексным. При протяжённых стриктурах в настоящее время используется увеличивающая пластика различными тканями (слизистая щёки, крайняя плоть и т.д.), что неизбежно вызывает дискомфорт и риск осложнений в зоне забора материала. Актуальна задача поиска тканеинженерных решений, которые позволили бы создавать биосовместимую ткань. Существуют отдельные экспериментальные работы на данную тему, однако предложенные скаффолды мало изучены и далеки от внедрения в практику.

В диссертации Д.В. Бутнару как раз поставлена комплексная задача, связанная с изучением стриктуры уретры. Это заболевание относится к социально значимым, а всё многообразие существующих методов порой не удовлетворяет ни врачей, ни пациентов: нередки случаи рецидива стриктуры, а также побочных явлений. Актуальна задача персонализированного подхода к лечению таких больных, ведь клинические рекомендации Минздрава не детализируют всё многообразие подтипов уретропластик. Не решён вопрос целесообразности повторной уретротомии при коротких стриктурах и поиска предикторов её эффективности, выбора между 1- и 2-этапной пластикой при протяжённых стриктурах.

На основании этого, тема диссертации, её цель и задачи являются актуальными медицинскими проблемами, требующими изучения.

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

Диссертационная работа включает в себя большой материал на различных ступенях изучения: эксперименты на культурах клеток, хирургические вмешательства с применением клеточных графтов на животной модели, сравнительных анализ существующих на практике методик хирургии и применение новых разработанных материалов для уретропластики в клиническом исследовании у пациентов со стриктурой уретры. По результатам исследования автором опубликована 41 научная печатная работа, получены 2 патента. Результаты доложены на многочисленных российских и зарубежных урологических конференциях.

ЗаклЮчения автора базируются на фактическом материале, они доказаны корректными статистическими методами обработки данных и приводит результаты в соответствии с принципами доказательной медицины. Автор в подробностях описывает ход операции начиная от укладки пациента и далее пошагово до завершения вмешательства, детализирует послеоперационное ведение пациентов, контрольные обследования. Приведены интраоперационные фотографии высокого качества.

На основании вышеизложенного, научные положения, выводы и рекомендаций сформулированы по результатам работы и обоснованы.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов.

Научная новизна исследования заключается в том, что автор впервые сравнил 6 распространённых методик лечения больных стриктурой уретры и более 10 их различных модификаций. Дополнительно он включил в анализ особенности анамнеза, протяжённость и локализацию стриктуры. Всё это позволило создать общий алгоритм выбора метода лечения. Впервые предложена и оценена в экспериментах на животной модели стриктуры уретры гибридная матрица, состоящая из коллагеновой стенки артерии и живых клеток эпителия слизистой ротовой полости. Разработанный графт автор впервые применил у 2 пациентов в клиническом исследовании.

Достоверность материала подтверждается большой экспериментальной базой, а также статистической обработкой материала.

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

Диссертация включает в себя 2 части: первая часть посвящена разработке подходов тканевой инженерии при стриктурах уретры; вторая – определению оптимального хирургического алгоритма при сужениях мочеиспускательного канала.

Базой проведения первой части работы выполнена, в части выделения клеток, получения материала и его характеризации, формирования тканеинженерных конструкторов для уретропластики - Институт 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).

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). 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 в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂). Состав ростовой среды: (Zurina I. et al., 2018). 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); Смену среды и визуальный контроль осуществляли 1 раз в 2-3 суток с использованием инвертированного микроскопа Primovert (Carl Zeiss, Германия).

Маркеры клеточной адгезии CD44, CD56 и CD326 и маркеры, характерные для ММСК: CD14, CD34, CD45, CD73, CD90 и CD105 были применены для установления фенотипа клеток использовали. Предварительная подготовка суспензии 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, (контрольный анализ проводился с помощью проточного цитофлуориметра Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, Inc, США).

На данном этапе исследования разработана концепция тканеинженерной конструкции, ее изучение *in vitro*, апробация *in vivo* на модели крыс / кроликов и использование у пациентов.

Вторая часть исследования - когортное ретроспективно-проспективное многоцентровое клиническое исследование. Когорты формировались 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 у которых диагностировали стриктуры уретры, которым выполнялось открытое или эндоскопическое пособие по поводу сужения мочеиспускательного канала.

Группой критериев невключения являлись пациенты, для которых единственным методом лечения было бужирование уретры, меатотомия и трансуретральная резекция шейки мочевого пузыря, отказавшиеся от подписания информированного согласия. Пациентам проводилось послеоперационное обследование проводилось через 1, 3 и 6 месяцев после операции, а затем ежегодно. Это позволило оценить эффективность лечения на ранних стадиях после операции и выявить возможные осложнения или рецидивы заболевания. Критерием для исключения из исследования являлась неявка пациента на послеоперационное обследование.

Оценка эффективности различных видов лечения пациентов со стриктурами уретры - первичная конечная точка данного исследования.

Перед оперативным лечение 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).

Решение о выборе метода лечения пациентов основывалось с учетом особенностей стриктуры уретры (локализация, протяжённость, количество, наличие предшествовавшего лечения, осложнения стриктурной болезни уретры, этиология), результатах урофлоуметрии, статусе пациента.

Во второй части сформулирован алгоритм выбора оптимального хирургического пособия при стриктурах различной локализации, протяжённости и этиологии.

С целью восстановления просвета мочеиспускательного канала при стриктурах было разработано и применено 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.

Автор предложил методику определения рекомендуемого вида операции, что позволяет реализовать персонализированный подход к пациентам и улучшить результаты лечения (а именно повысить эффективность и уменьшить частоту осложнений). В работе показано, что в случае рецидива проведение повторной уретротомии не целесообразно, что позволит избежать большого количества заведомо не эффективных вмешательств.

В диссертации описывается методика формирования гибридной матрицы из коллагена и клеток эпителия. Данная разработка имеет большую теоретическую. Значимость для медицины в целом, так как клеточные технологии и биосовместимые графты сейчас находят применения в самых разных областях медицины.

Практические рекомендации имеют большую ценность для оптимизации ведения пациентов, с ними важно ознакомиться всем практикующим урологам, выполняющим такую хирургию.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации.

Диссертация построена по классической схеме, она состоит из введения, 3 глав с результатами собственных исследований, выводов, практических рекомендаций. Работа изложена на 281 листах машинописного текста, содержит 12 таблиц и 159 рисунков. Список литературы насчитывает 236 источников. Все проведённые операции иллюстрированы соответствующими фотографиями.

План исследования отвечает поставленным задачам. Диссертация включает обширную доклиническую часть (работа с культурами клеток и коллагеном, операции на животной модели), экспериментальную клиническую часть, сравнительную клиническую часть. Приведённые выводы и практические рекомендации основаны на результатах работы и логически вытекают из них. 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. В

работе содержится решение актуальной научной проблемы, а именно – улучшение 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 г. № 842 предъявляемым к диссертациям на соискание учено степени доктора медицинских наук, а её автор заслуживает присуждения учёной степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.13. – Урология и андрология.

Официальный оппонент, доктор медицинских наук, профессор, руководитель Центра урологии и андрологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна»

— Кызласов Павел Сергеевич

Подпись профессора Кызласова Павла Сергеевича заверяю

12.09.2023г.

Ученый секретарь Федерального Государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна», к.м.н.

Евгений Владимирович Голобородько



Адрес: 123098, г. Москва, ул. Живописная д. 46.

Тел: + 7(499)190-85-85, +7 (499) 190-96-92, +7 (926) 494-20-10

E-mail: evgeny.goloborodko@gmail.com, mbufmbc@mail.ru