

НЕКОММЕРЧЕСКОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ КАРАГАНДЫ»

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на соискание степени доктора философии
по специальности: 6D110100 «Медицина»

**Тема: «Морфологическое обоснование применения
децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины при нефропексии
(экспериментальное исследование)»**

Исполнитель: Абатова Айгерим Нуркасиевна

Научные консультанты:
доктор медицинских наук, профессор НАО МУК
Тусупбекова Майда Масхаповна;

Doctor PhD, Director of Surgery "B" Unit,
Shaare Zedek Medical Center, Jerusalem (Israel)
Alberton Joseph

Караганда, 2022 год

Актуальность

Нефроптоз — заболевание, которое проявляется опущением почки. Причиной заболевания является ослабление (врожденное или приобретенное) связочного аппарата почки. Опущение сопровождается натяжением нервно-сосудистого пучка. Данное патология является одной из распространённых заболеваний брюшинного пространства с частотой выявления у 1,54% женщин и 0,12% мужчин. Среди пациентов, страдающих нефроптозом около 70 % составляют женщины в возрасте от 20 до 50 лет. [1].

Осложнениями нефроптоза могут проявляться в виде сосудистой патологии или же уродинамическими нарушениями, при более выраженной стадии нефроптоза приводит к хронической почечной недостаточности [2,3,4,5]. Как известно, уровень маркеров окислительного стресса, увеличивается по мере прогрессирования хронического заболевания почек и значительно коррелирует с уровнем почечной функции, что сопровождается повышенным окислительным стрессом, проявляющимся вторичными продуктами распада перекисного окисления липидов - малонового диальдегида и продуктом антиоксидантной защиты - глутатионпероксидазы [6].

При выраженном нефроптозе эффективным методом лечения является хирургическая коррекция с использованием современных технологий и материалов, не обладающих побочными действиями в зоне имплантации [7].

Известно, что применение известных синтетических имплантатов в хирургии могут сопровождаться отдаленными осложнениями в виде хронизации процесса с формированием грубых рубцовых изменений в зоне имплантации, ведущее к малоподвижности и морфофункциональным нарушениям органа. Среди тяжелых осложнений в постимплантационном периоде следует отметить образование свищей, пролежни, что влияет на общее соматическое состояние и качество жизни пациентов, обусловленные гипертензией и развитием выраженного болевого синдрома [8-13].

Поиск альтернативных материалов более интенсивно начался в середине 19 века. В научных исследованиях последних лет отмечено, что в реконструктивной хирургии альтернативным материалом являются биологические имплантаты, одним из первых и активных сторонников данной гипотезы был Н.И. Краузе [14].

Так в настоящее время, перспективными являются биологические имплантаты, представляющие собой внеклеточный матрикс (ВКМ)[15]- это имплантаты, получаемые из донорского материала животного и/или человека путем тканевой инженерии. Внеклеточный матрикс – это комплекс функциональных и структурных протеинов, представленными гликопротеинами, протеогликанами, хондроитином, гиалоурановой кислотой и коллагенами. Ведущим свойством является поддержание и сохранение каркаса ткани, участвующие в процессах передачи сигнала, регуляции роста клеток и их дифференцировки, также в апоптозе клеточных элементов, что дает основание использовать внеклеточный матрикс в качестве имплантатов в тканеинженерной конструкции и регенеративной медицине [16-20]

Механизмы, с помощью которых эти биокаркасы способствуют конструктивному ремоделированию и благоприятным клиническим результатам, включают высвобождение или создание эффекторных молекул, которые привлекают эндогенные стволовые клетки/клетки-предшественники к месту размещения каркаса и модулируют иммунный ответ, в частности, активацию противовоспалительного макрофага [21]. Также встроенные

в внеклеточные матриксы нановезикулы (матричные нановезикулы) обеспечивает механистическое понимание индуктивных свойств биоматериала ВКМ и регуляции тканевого гомеостаза [22].

Несмотря на прогресс изучения биосовместимых материалов в урологии и в медицине в целом, с оценкой морфологических и биохимических процессов остаются недостаточно изученными вопросы постимплантационных осложнений как фиброзно-склеротический процесс в зоне контакта, а также состояние степени активности малонового диальдегида и глутатионпероксидазы в организме на имплантат. В связи с этим представляет практический интерес научные изыскания, посвященные сравнительному анализу состояния гистоструктуры и биохимических процессов в зоне контакта децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины с тканью почки и паранефральной клетчаткой, так как мы не встретили в доступной нам литературе работ освещающих данную проблему.

Цель исследования: провести морфологическое и биохимическое обоснование применения децеллюляризованного (внеклеточного) матрикса ксенобрюшины в сравнении с недецеллюляризованной ксенобрюшиной и сеткой УльтраПро при проведении нефропексии в эксперименте на животных.

Задачи исследования:

1. Изучить сравнительный анализ уровня малонового диальдегида и активность глутатионпероксидазы в тканях почки и плазме крови лабораторных животных при использовании децеллюляризованного (внеклеточного) матрикса ксенобрюшины в сравнении с недецеллюляризованной ксенобрюшиной и сеткой УльтраПро.

2. Оценить макроскопические характеристики зон имплантации в динамике при нефропексии с различными видами имплантатами.

3. Провести сравнительный гистологический анализ клеточного инфильтрата в зоне контакта ткани почек с внеклеточным матриксом ксенобрюшины, недецеллюляризованной ксенобрюшиной и сеткой УльтраПро.

4. Провести сравнительный морфометрический анализ процесса созревания соединительной ткани в репрезентативных участках контакта различных видов имплантатов с тканью почки и околопочечной жировой клетчаткой.

Научная новизна.

1. Впервые разработана и внедрена методика нефропексии с применением различных видов в эксперименте на крысах.

2. Впервые дано морфологическое описание с проведением морфометрического анализа репаративного процесса новообразования соединительной ткани при имплантации недецеллюляризованной ксенобрюшины и ВКМ ксенобрюшины.

3. Впервые установлено, что использование внеклеточного матрикса ксенобрюшины при нефропексии на крысах в отдаленном периоде наблюдается менее выраженный процесс коллагенизации с фиброзированием, при этом коллаген по структуре организован, упорядочен, без признаков хронизации процесса по сравнению при имплантации сетки УльтраПро и недецеллюляризованной ксенобрюшины.

4. Впервые описан сравнительный анализ малонового диальдегида и глутатионпероксидазы в ткани почек и крови крыс при применении внеклеточного матрикса ксенобрюшины для нефропексии.

Связь диссертации с другими научно-исследовательскими работами.

Диссертационная работа выполнена в рамках научно-исследовательского проекта по грантовому финансированию МОН РК по теме 3242/ГФ4 «Разработка и внедрение новых видов имплантатов при лапароскопической нефропексии» с государственной

регистрацией №0115РК00306, исследования проведены на кафедре патологической анатомии и молекулярной биохимии КГМУ.

Практическая значимость:

1. Практическая значимость диссертационной работы состоит в том, что результаты исследования могут быть использованы в качестве базы клинического исследования применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины при нефропексии.

2. Применение внеклеточного матрикса ксенобрюшины при нефропексии характеризуется низкой активностью в биохимических результатах показателей малонового диальдегида в ткани почки и плазме крови крыс относительно групп с применением недецеллюляризированной ксенобрюшины и сетки УльтраПро.

3. Данные сравнительного морфологического анализа с использованием внеклеточного матрикса при нефропексии сопровождался стадийно-репаративным процессом в зоне контакта ткани почек с матриксом с формирования зрелой соединительной ткани, без вовлечения окружающей ткани в спаечный процесс и без хронического репаративно-регенерационного процесса.

Внедрение в практику.

Полученное свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права №1672 от 10.08.2016 г. «Методика моделирования нефропексии в эксперименте» [23] и Патент Республики Казахстан на изобретение № 43378 от 09.10.2017 г. «Способ хирургической коррекции нефроптоза» [24] внедрены при проведении научно-экспериментальных исследований при нефропексии.

По результатам проведенного экспериментального исследования выпущена в соавторстве научная монография: «Результаты моделирования нефропексии различными способами в эксперименте» [25], утвержденное на заседании Ученого совета Карагандинского Государственного Медицинского университета, протокол №7 от 24.01.2018 г., данное издание может быть рекомендовано специалистам, занимающихся вопросами нефропексии при подвижной почке и для студентов высших учебных медицинских заведений при проведении курса оперативной урологии и клинической патоморфологии.

Материалы и методы исследования.

Дизайн исследования.

Проведено экспериментальное сравнительное исследование по оценке морфологических и биохимических особенностей взаимодействия внеклеточного матрикса ксенобрюшины, недецеллюляризированной ксенобрюшины и сетки УльтраПро с тканями почки и околопочечной жировой клетчатки короткошерстных половозрелых крыс. Данное исследование одобрено Комитетом по биоэтике Карагандинского государственного медицинского университета протокол № 69 от 26.11.2015 года. Эксперимент проводился с соблюдением рекомендаций Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18.03.1986 г.). Экспериментальная работа по содержанию и уходу за лабораторными животными, соответствовала нормативам, приведённым в руководствах Guide for care and use of laboratory animals. Eight edition. ILAR publication [26] и Американском медицинской ассоциации ветеринаров American Veterinary Medical Association Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition.

Исследование проводилось на 144 короткошерстных белых беспородистых половозрелых крысах обоего пола, одинакового возраста, массой 200-220 г. В биохимическом исследовании показателей малонового диальдегида и активности глутатионпероксидазы ткани и плазмы крови было дополнительно выделено 6

короткошерстных белых беспородистых половозрелых крыс, составивших контрольную группу для биохимического исследования.

Животные были распределены случайным образом в 3 группы и 6 подгрупп по 8 особей. 3 группы исследования были сформированы в соответствии с применяемым материалом имплантата: в первой группе использован децеллюляризованный (внеклеточный) матрикс ксенобрюшины; во второй группе - недецеллюляризованная ксенобрюшина; в третьей группе - макропористая частично рассасывающаяся легкая сетка УльтраПро. Каждая подгруппа соответствовала стандартному сроку выведения животного из эксперимента: на 7 сутки; 14 сутки; 21 сутки; 30 сутки; 90 сутки и 180 сутки. Идентификация животных осуществлялась путем присвоения каждому экспериментальному животному индивидуального номера меткой красителем на дорсальной поверхности тела.

Экспериментальное исследование проводилось на базе патоморфологической лаборатории кафедры патологической анатомии и на базе вивария Карагандинского государственного медицинского университета. Материалом биохимического исследования выступали плазма крови крыс, криогомогенизат почки. Оценка показателей МДА и ГПО проводилось на кафедре молекулярной биологии КГМУ. Для микроскопического исследования резецировали фрагмент ткани в области имплантата. Репрезентативный участок составлял фрагмент контакта ткани почки, паранефральной клетчатки с имплантатом вне шовного материала. Забор материала для гистологического исследования проводился по общепринятой методике. Описание макроскопического исследования и стеклопрепаратов проведено на базе кафедры патологической анатомии Карагандинского государственного медицинского университета.

Методика изготовления децеллюляризованного (внеклеточного) матрикса ксенобрюшины.

Научные исследования под руководством Аbugалиева К.Р. и Огай В.Б по обработке децеллюляризованного (внеклеточного) матрикса проводилось на базе научной лаборатории ТОО «General Genetics». Принцип децеллюляризации образцов брюшины проводили с помощью детергент-ферментативного метода. Далее добавляли раствор для децеллюляризации содержащий 0,25% додецилсульфат натрия и 0,5% Тритон Х. Процедуру децеллюляризации повторяли 2 раз. Стерилизация ксеногенного материала производили с помощью γ -излучения [27].

Методы статистической обработки результатов исследования.

Для статистического анализа использовали SPSS Statistics 22. Анализ данных проводили при уровне значимости $\alpha=0,05$. Проверку нормальности распределения количественных данных проводили с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Количественные данные представляли при помощи медианы и квартилей. Для качественных данных рассчитывали долю и 95% доверительный интервал доли. Для сравнения независимых выборок использовали U критерий Манна-Уитни и Краскелла-Уоллеса. Для оценки взаимосвязи был использован коэффициент корреляции Пирсона и Спирмена.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При имплантации недецеллюляризованной ксенобрюшины и сетки УльтраПро выявлено формирование фибросклеротической ткани в зоне контакта имплантатов и ткани почек.

2. При применении внеклеточного матрикса ксенобрюшины биоматериала в качестве имплантата при нефропексии не выявлено морфологических признаков хронической персистенции воспалительной реакции и процесса фиброобразования и не обнаружено повышения уровня малонового диальдегида в отдаленном периоде;

3. Впервые было установлено на основании морфологических, морфометрических и биохимических данных, что наиболее оптимальным для проведения нефропексии в сравнении с недецеллюляризованной ксенобрюшиной и сеткой УльтраПро является предпочтительным внеклеточный матрикс ксенобрюшины.

Выводы:

1. Во всех исследуемых группах *плазме крови* статистически значимых различий данных показателей МДА не выявлено на 30 сутки относительно контроля, при оценке показателя глутатионпероксидазы во всех группах эксперимента не выявлено достоверно значимых различий на 21 сутки. В группе с использованием внеклеточного матрикса ксенобрюшины показатели МДА в *ткани почки* приходились в соответствие контрольной группе на 90 сроки ($p=0,382$) в отличии от групп сравнения, где сохранялась более длительная активность МДА, так при имплантации недецеллюляризованной ксенобрюшины приходилось на 180 сутки ($p=0,161$), а в группе с УльтраПро сохранялось достоверно значимое различие относительно контрольной группы ($p=0,001$). Активность глутатионпероксидазы в ткани животных в группе внеклеточного матрикса ксенобрюшины не выявлено статистически значимых различий относительно контроля, что приходилось на 30 сутки экспозиции, а в группах сравнения активность ГПО составило в соответствие контрольной группе на 180 сутки ($p=0,446$; $p=0,442$).

2. Сравнительный анализ макроскопической картины зоны контакта почек при применении различных видов имплантатов показал, что формирование нежных тонких тяжей волокнистой соединительной ткани происходит к 21- 30 суткам ($p=0,118$). К 90-180 прочность спаек и степень вовлечения окружающих тканей статистически значимо выше у животных в группе с использованием сетки УльтраПро и недецеллюляризованной ксенобрюшины ($p=0,016$).

3. Сравнительный гистологический анализ клеточного инфильтрата в зоне контакта ткани почек при нефропексии внеклеточным матриксом ксенобрюшины показал активное снижение клеточного пула и динамичное увеличение популяции стромальных клеток и наличием коллагеновых волокон, а значит образованием зрелого соединительнотканного контакта в зоне имплантации к 21-30 суткам экспозиции. В группе с применением недецеллюляризованной ксенобрюшины и с сеткой УльтраПро выявлено активное коллагенообразование, резкое увеличение популяции стромальных клеток 14-21 суткам экспозиции ($p=0,045$) со слабой лимфоцитарной инфильтрацией ($p=0,004$) при нефропексии, что свидетельствует о формировании соединительной ткани в данных группах опыта.

4. Морфометрический анализ гистоструктуры в зоне контакта в группах с использованием внеклеточного матрикса ксенобрюшины и недецеллюляризованной ксенобрюшины, показал формирование зрелого рубца на 21- 30 сутки экспозиции при нефропексии. При использовании в качестве имплантата сетки УльтраПро было отмечено формирование соединительного контакта на 14 - 21 сутки с последующим процессом фиброобразования ($p=0,007$). В отдаленные сутки опыта с использованием внеклеточного матрикса ксенобрюшины во всех случаях определялась зрелая и хорошо организованная фиброзная и фиброваскулярная ткань: коллагеновые волокна были упорядочены композиционно ($p=0,016$) в отличии от групп с сеткой УльтраПро и недецеллюляризованной ксенобрюшиной, где выявлено хаотично расположенных коллагеновых колоконов ($p=0,0016$), значительно большее отложение коллагена ($p=0,000$).

На основании результатов диссертационной работы можно сформулировать следующие **практические рекомендации:**

Проведенный макроскопический, гистоморфометрический и биохимический анализы показали, что ксенобрюшина, использованная для нефропексии обладает

положительной динамикой репаративного процесса с формированием соединительнотканного контакта в репрезентативном участке, отсутствуют признаки хронического процесса, имеет место более высокие темпы снижения малонового диальдегида и ранней активацией глутатионпероксидазы в постимплантационном периоде. На основании морфологических, биохимических результатов может рассматривать как более предпочтительным материалом для клинического исследования при нефропексии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Урология: учебник / под ред. Н. А. Лопаткина. - 7-е изд., перераб. и доп. - М.: ГЭОТАР – Медиа. – 2011.-С.1 – 816.
- 2 Нестеров С.Н., Ханалиев Б.В., Мамедов Х.Х. Современный взгляд на проблемы нефроптоза // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. – 2014. – №2. – С. 99-101.
- 3 Matthew T Menard. Nutcracker syndrome: when should it be treated and how?// *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther.* -2009 . – №21(2).-P.117-24.
- 4 Ahmed N Ghanem Features and complications of nephroptosis causing the loin pain and hematuria syndrome. A preliminary report // *Saudi Med J.* -2002.-Vol.23.- № 2.-P.197-205.
- 5 Tanja Decoster , Veerle Schwagten, Jeroen Hendriks, Luc Beaucourt. Renal colic as the first symptom of acute renal vein thrombosis, resulting in the diagnosis of nephrotic syndrome// *Eur J Emerg Med.* – 2009.- №16(4).-P. 170-171
- 6 Tabriziani H., Lipkowitz M., Vuong N. Chronic kidney disease, kidney transplantation and oxidative stress: a new look to successful kidney transplantation // *Clin Kidney.* – 2018. – Vol. 11(1). – P. 130-135.
- 7 Andrea Mogorovich, Cesare Selli , Maurizio De Maria¹, Francesca Manassero, Jacopo Durante , Lucio Urbani Clinical reappraisal and state of the art of nephropexy// *Urologia.*– 2018 Nov. – 85(4). – P.135-144.
- 8 Глыбочко П.В., Аляев Ю.Г. и др. Урология. – Изд. 3-е, перер. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 624 с.
- 9 Патент РФ № 2400160 «Способ протезирующей герниопластики срединных вентральных грыж».
- 10 Aboian I.A., Grachev S.V., Shiranov A.B., Mitusov V.V. *Urologiia.* Mar-Apr 2004.- №2. – P.47-50.
- 11 Погорелова М. П. Ультразвуковая эксцизия инфицированных сетчатых имплантатов после герниопластики: автореф. ... канд. док. мед. наук: 14.01.17. –Уфа, 2020. – С. 5-15
- 12 Spiller K.L., Anfang R.R., Spiller K.J. et al. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds // *Biomaterials.* – 2014. –Vol. 35. – P. 4477-4484.
- 13 Никонович С.Г. и др. Использование полипропиленовой сетки для фиксации патологически подвижной почки // *Медицинский журнал.* – 2010. – №1. – С. 69-72.
- 14 Краузе Н.И. О механизме заживления гранулирующих ран // *Хирургия.* – 1942. – №10. – С. 11-17
- 15 Badylak S.F., Brown B.N., Gilbert T.W., Daly K.A., Huber A., Turner N.J. Biologic scaffolds for constructive tissue remodeling // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 31. – P. 316-319.
- 16 Hussey, G.S., Dziki, J.L. & Badylak, S.F. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. // *Nat Rev Mater.*- 2018.- №3. –P.159–173.
- 17 Yang J.Z., Qiu L.H., Xiong S.H., Dang J.L., Rong X.K., Hou M.M., Wang K., Yu Z., Yi C.G. Decellularized adipose matrix provides an inductive microenvironment for stem cells in tissue regeneration. // *World J Stem Cells.*-2020. Vol.12. – №7. – P.585-603.
- 18 Ji-Zhong Yang, Li-Hong Qiu, Shao-Heng Xiong, Juan-Li Dang, Xiang-Ke Rong, Meng-Meng Hou, Kai Wang, Zhou Yu, Cheng-Gang Yi. Decellularized adipose matrix provides an inductive microenvironment for stem cells in tissue regeneration // *World J Stem Cells.* – 2020.-Vol. 26.-№12 (7).-P.585-603.
- 19 Saldin L.T., Cramer M.C., Velankar S.S., White L.J., Badylak S.F., "Extracellular Matrix Hydrogels from Decellularized Tissues: Structure and Function." *Acta Biomater.* – 2017. – № 49. – P. 1-15.

- 20 Dearth C.L., Slivka P.F., Stewart S.A. et al. Inhibition of COX1/2 alters the host response and reduces ECM scaffold mediated constructive tissue remodeling in a rodent model of skeletal muscle injury// *Biomaterials*. – 2015. – Vol. 32. – P. 50-60
- 21 Meezan E., Hjelle J.T., Brendel K., Carlson E.C.. A simple, versatile, nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues // *Life Sci*. – 1975. – №17. – P.1721–1732.
- 22 Huleihel L, Hussey GS, Naranjo J.D., Zhang L., Dziki JL, Turner N.J., Stolz D.B., Badylak S.F. Matrix-bound nanovesicles within ECM bioscaffolds.-2016.- *Sci Adv* 2.-P.1-11
- 23 Свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права. Методика моделирования нефропексии в эксперименте/ Н.Т. Абаатов, Р.М. Бадыров, А.Н. Абаатова и др.; опубл. 10.08.16, Бюл. №1672. – С.1-2
- 24 Патент Республики Казахстан на изобретение № 43378 от 09.10.2017 г. Абаатов Н.Т., Бадыров Р.М., Абаатова А.Н. «Способ хирургической коррекции нефроптоза»
- 25 Абаатова Н.Т., Тусупбекова М.М., Абаатова А.Н. и др. Результаты моделирования нефропексии различными способами в эксперименте. – Караганды: Гласир, 2017. – 100 с.
- 26 Albus U. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edn). *Laboratory Animals*. 2012. –Vol.46.–№3.–P.267-268.
- 27 Пат. № 30382 РК. Биологическое покрытие для лечения ожогов и ран / Абугалиев К.Р., Огай В.Б., Данлыбаева Г.А.; опубл. 15.09.2015. 14, Бюл. №9. – 5 с