

Отзыв

официального оппонента, доцента, д.м.н. Кызласова П.С. на диссертационную работу Охоботова Дмитрия Александровича «Оценка эффективности современных методов лечения мужского бесплодия и возможности использования обогащенных клеточных культур» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.13 – урология и андрология (медицинские науки).

Актуальность темы

Диссертация Охоботова Д.А. посвящена оценке эффективности современных методов лечения мужского бесплодия. Высокая распространенность и полиэтиологичность заболевания, несмотря на ее активное изучение, до сих пор представляют собой серьезную медицинскую проблему, и вызывает серьезный интерес медицинской общественности, так как эффективность лечения современных методов мужского бесплодия, не превышает 45,9%.

В представленной работе изучаются возможности стимулирующего лечения с помощью обогащенных культур стволовых и прогениторных клеток различной природы, а также созданного на основе клеточного секрета препарата, который обладает значительным регенеративным потенциалом и может считаться отдельным эффективным методом лечения мужского бесплодия.

Таким образом, тема исследования является актуальной, а ее результаты могут способствовать улучшению результативности терапии пациентов с мужским бесплодием различной этиологии и дальнейшей разработке альтернативных методов лечения с помощью терапии продуктами секреции стволовых и прогениторных клеток.

Научная новизна исследования и полученных результатов в диссертации

В клинической части данной диссертационной работы впервые проведена оценка эффективности полного цикла лечения бесплодия у пар с мужским фактором. Изучены и проанализированы неблагоприятные исходы лечения различных форм мужского бесплодия и проведена прогностическая оценка вероятности получения беременности в паре, где мужчины имеют то или иное заболевание, нарушающее процессы формирования сперматозоидов и снижающих порог фертильности. Впервые проведена сравнительная многофакторная оценка эффективности терапии клеточными культурами, различных видов и происхождения в различных тканеспецифичных вариантах и сочетаниях (патент РФ №. RU2653779C1 «Способ стимуляции сперматогенеза») у животных. Проведены сравнительные анализы возможностей повышения эффективности методов клеточной терапии у экспериментальных животных, при би и монологатеральном подкапсульном введении обогащенных клеточных культурами различного происхождения сравнение эффективности культур от старых и молодых животных. Экспериментально определена минимальная терапевтическая клеточная доза, которая обуславливает эффективность терапии, для различных видов культур и обосновано отсутствие необходимости ее дальнейшего увеличения. С помощью комплексного иммуногистохимического маркерного анализа тканей проанализированы все фазы жизненного цикла стволовых клеток на фоне экспериментальной терапии клеточными культурами. Впервые проанализирована безопасность использования кондиционированных сред с секретом культур стволовых/прогениторных клеток на коллагеновом носителе, проанализированы их регенеративные возможности восстановления нарушенного сперматогенеза у животных, в сравнении с клеточной культурой (патент РФ RU2652902C1 «Способ стимуляции сперматогенеза»), что позволило создать уникальный препарат для лечения нарушений сперматогенеза и фертильности у пациентов. Тема и содержание

диссертации соответствует паспорту научной специальности 3.1.13 – урология и андрология: пунктам 1, 2 и 3, так как она посвящена изучению уроандрологического многофакторного заболевания - бесплодия у мужчин (N46, по МКБ-10), а также современным возможностям лечения и прогнозирования эффективности лечения, с учетом клинической формы и одновременного сочетания нескольких факторов, которые к ней приводят.

Значимость для науки и практики, полученных автором результатов

Значимость результатов диссертационной работы для науки и практики не вызывает сомнений. Изложенные в работе результаты, расширяют фундаментальные представления о роли стволовых и прогениторных клеток, их функций и возможности размножения в условиях клеточной ниши, на фоне значительных повреждений функции сперматогенного эпителия. При этом получены новые данные о протекании репаративных процессов восстановления сперматогенеза в забарьерном органе, в условиях подавленного иммунного ответа. Обоснованы данные по оптимизации эффективности трансплантируемых культур в зависимости от их вида, происхождения, фактора билатеральности, возраста донора и других факторов. Полученные в работе данные позволяют более эффективно оценивать роль клеточной ниши, представлять возможности и силу репарационных процессов в яичке, а также анализировать возможности контроля в зависимости от длительности сроков.

Предложенный материал посвящен разработке и усовершенствованию методов диагностики и лечения мужского бесплодия, так как в работе рассматривается альтернативная и экспериментально подтвержденная эффективная технология по ее лечению. Данная работа содержит большой клинический и экспериментальный разделы, которые посвящены разработке

новой технологии, решающей клиническую проблему в эксперименте. Современные методы лечения мужского бесплодия, даже с учетом возможностей ВРТ, обладают недостаточной эффективностью и способны обеспечить решение проблемы в 45,8% случаев, причем при некоторых формах обструктивная азооспермия, криптозооспермия и.т.д. ВРТ является единственным пригодным методом. С учетом возможностей предлагаемого метода трансплантации обогащенными клеточными культурами сделан важный вывод о том, что клетки в отсутствии клеточной ниши, под воздействием случайных контролирующих сигналов способны начинать спонтанную и непредсказуемую дифференцировку, поэтому более безопасно использование не самих клеточных культур, а их секрета, содержащего все необходимые стимулирующие и регенеративные медиаторы, но при этом лишенные возможности неконтролируемой дифференцировки. На базе проведенных исследований синтезирован препарат для клинического применения под названием «Медирег», который в настоящее время проходит первую фазу клинических испытаний.

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

Следует отметить, что основными аспектами, которые автор представил в работе, является оценка эффективности, биологическая и клиническая безопасность исследуемых методов лечения мужской фертильности с помощью обогащенных клеточных культур и их продуктов. При анализе результатов лечения 292 пациентов с клинически значимыми нарушениями в спермограмме и клинически здоровыми партнершами был сделан вывод, что имеющиеся в арсенале репродуктолога современные методы лечения мужского бесплодия в настоящее время обладают сравнительно малой эффективностью, а использование вспомогательных

репродуктивных технологий, при мужском факторе составляет 21,08% на 1 попытку.

Предложенный метод лечения мужского бесплодия с помощью различных видов обогащенных клеточных культур и их продуктов (20 групп экспериментальных животных) (мыши, крысы, $n=164$), в различных клинических сочетаниях (ксеногенный, аллогенный и аутологичный варианты).

Полученные данные позволили сделать важный вывод о том, что, стволовые клетки способны автономно дифференцироваться в условиях клеточной ниши, будучи при этом крайне уязвимы к внешним управляющим сигналам, и, поэтому, опасны для клинического применения. Альтернативно разрабатываемые клеточные продукты, используемые в работе, представляющие собой белковые фракции, продуцируемые этими клетками, демонстрируют сходный клинический результат, но при этом более стабильны и предсказуемы, а, также более безопасны. На основании полученных данных был разработан новый препарат для лечения поврежденного сперматогенеза, созданный на основе клеточных продуктов, который, в настоящее время проходит первую фазу клинических испытаний.

Выводы данной работы соответствуют поставленным задачам, анализ материала с помощью непараметрической статистики для малых групп сомнений в достоверности представленного материала не вызывает. Основным выводом данной работы является то, что уже при нынешнем уровне развития науки, технологии, возможности регенеративной медицины способны компенсировать повреждения сперматогенеза у мужчин, что позволит обеспечить индивидуальный подход в лечении тяжелых клинических случаев.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности в целом и оформления

Диссертационная работа изложена на 244 страницах компьютерного текста, состоит из введения, 8 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы, включающего 21 отечественных и 172 зарубежных источников литературы. Работа иллюстрирована 46 таблицами, 28 диаграммами и 47 рисунками.

Литературный обзор посвящен вопросам эпидемиологии и этиологии мужского бесплодия, проведен краткий анализ современных методов диагностики и лечения нарушений сперматогенеза у пациентов с мужским фактором, в том числе ВРТ (ЭКО-ИКСИ), проведен анализ литературных данных перспективных методов лечения мужского бесплодия, включающих клеточные технологии, генную инженерию, экспериментальную регуляцию пола на животных моделях.

Глава 2 «Материалы методы» изложена подробно, методы анализа данных, включая непараметрический анализ для малых групп, вопросов не вызывают.

Глава 3 представляет собой клинический раздел, созданный на основе анализа результатов обследования 1012 супружеских пар, причем нарушения спермограммы были выявлены у 554 мужчин (54,7%), а женский фактор встречался у 644 женщин (63,6%). Интересно, что в исследуемых парах только мужской фактор бесплодия был выявлен у 292 мужчин (28,8%), только женский – у 382 женщин (37,7%) и у 262 пар были выявлены репродуктивные проблемы у обоих супругов (25,8%), что еще раз подтверждает целесообразность обследования именно пары, а не каждого из партнеров по отдельности. Основной анализ эффективности лечения нарушений сперматогенеза и оценки эффективности процедур ВРТ был изучен на 292 мужчинах (28,8%) с нарушениями спермограммы и здоровыми женами.

Полученные данные позволяют прогнозировать эффективность лечения мужского бесплодия, что важно для их клинического использования в репродуктологии. Эффективность современных методов лечения infertility, включающих ВРТ, составляет 45,8%. Использование вспомогательных репродуктивных технологий не является гарантией получения беременности в супружеской паре, так как одна попытка эффективна в среднем в 21,08% случаев. У мужчин, бесплодных по 1 фактору, общая частота неудач статистически достоверно составила 15,9%, по 2 факторам 43,6%, при наличии более двух факторов – 93,6%. По результатам проведенного анализа сделан вывод недостаточной эффективности современных методов лечения и для преодоления этой проблемы предложена экспериментальная терапия обогащенными клеточными продуктами, как метод альтернативного лечения.

Результаты экспериментальной части работы представлены в главах 4, 5 и 6, и представляют собой анализ данных исследований различных межвидовых, внутривидовых вариантах, а также пересадку в пределах одного организма. Полученные результаты изменений сперматологической картины у животных, подкрепляются данными уровней половых гормонов, расчетом индекса Астраханцева- Соловьева, а также индексом фертильности, исследованием морфологией тканей, а также комплексным иммуногистохимическим контролем. При этом выяснено, что наиболее эффективные результаты получаются при трансплантации в рамках одного организма (количество новорожденных крысят составило $3,6 \pm 0,54$, в ксеногенном максимально – $2,69 \pm 0,64$, в аллогенном – $2,9 \pm 0,58$). Репродуктивный потенциал при этом, безусловно, ниже, чем у здоровых животных.

В результате сделан вывод о том, что клеточные культуры различного происхождения обладают клинически значимым регенеративным

потенциалом для регенерации сперматогенеза у животных, что имеет важное значение для репродуктологии (ВРТ).

В главе 7 представлены результаты дополнительных экспериментов, уточняющие некоторые частные вопросы: расчет необходимой клеточной дозы, исследования влияния фактора билатеральности, возраст донора, для получения используемой культуры, а также комплексные возможности маркерного анализа различных фаз жизнедеятельности стволовых клеток в условия поврежденного сперматогенеза в донорском организме. В этой же главе представлен раздел использования секрета стволовых и прогениторных клеток жировой ткани (стимулирующих факторов, которые образуются в процессе жизнедеятельности стволовых и прогениторных клеток) в сравнении с клеточными культурами того же происхождения. Согласно полученным результатам, более оптимальна терапевтическая доза 500000 ЕД, на 1 яичко, потому, что использовать дозы в диапазоне от 50000 до 500000 ЕД нецелесообразно, так как на этой дозе восстановление репродуктивного потенциала было максимальным - 37,5%. Сравнительное использование культуры яичка новорожденной крысы было более эффективным, по сравнению с культурой, полученной от взрослого животного, так как коэффициент фертильности в этой группе составил – 2,49, что в 2 раза больше, чем у «взрослых» животных (1,25).

Одновременная трансплантация клеточных культур в 2 яичка более эффективна, по сравнению с односторонним, что подтверждается данными гормонов крови, гистологическими исследованиями, исследованиями индекса сперматогенеза и фертильности, а животные, перенесшие билатеральную терапию, имеют в 3 раза больший репродуктивный потенциал.

Концентрированная среда с факторами роста клеток жировой ткани оказывает клинически значимое стимулирующее действие на сперматогенез сравнимое с эффектом клеточной культуры ($5,14 \pm 1,21$ ЕД), а при

использовании мезенхимальных стволовых клеток – $6,98 \pm 1,17$ ЕД, что сравнимо по клинической эффективности. Это свидетельствует о том, что использование клеточного секрета стволовых клеток более перспективно, по сравнению с самими клеточными культурами, так как позволяет минимизировать осложнения, описанные в данном разделе.

Диссертация Охоботова Д. А. является завершённой работой, заслуживает положительной оценки, принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертации нет.

В ходе ознакомления с работой возникло ряд вопросов:

Каким вы видите идеального донора для получения максимального эффекта, предлагаемого вами лечения?

Почему у пациентов с наличием сопутствующих воспалительных заболеваний, в перспективе лечения прогноз хуже, чем у пациентов аномалиями развития, например, с крипторхизмом?

Почему у пациентов с наличием инфекций, передающихся половым путем, прогноз на получение беременности самый неблагоприятный?

Выводы диссертационной работы соответствуют поставленным задачам, при этом некорректные заимствования отсутствуют.

Текст диссертации, представленной в совет, идентичен тексту диссертации, размещенной на сайте ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава РФ.

Аннотация диссертации полностью отражает основные данные, представленные в диссертации.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Основные результаты работы представлены в 28 публикациях, входящих в список рецензируемых научных журналов, рекомендуемых высшей аттестационной комиссией Минобрнауки РФ, а также в международные базы данных Scopus и PubMed. Всего по теме диссертационной работы опубликовано 76 печатных работ, получено 3 патентных авторских свидетельства Российской Федерации. Научные публикации достаточно полно отражают результаты диссертационного исследования и выводы, сделанные автором.

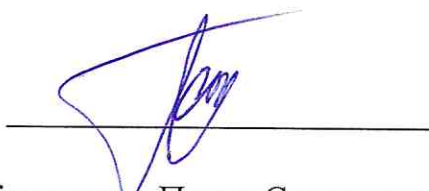
Заключение.

Диссертация Охоботова Д. А. на тему «Оценка эффективности современных методов лечения мужского бесплодия и возможности использования обогащенных клеточных культур» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой, на основании выполненных автором исследований, разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как крупное научное достижение в преодолении бесплодия у пар с мужским фактором infertility, что имеет важное научно-практическое значение для урологии, андрологии и репродуктологии.

По своей актуальности, новизне, научно-практической значимости диссертация Охоботова Дмитрия Александровича на тему «Оценка эффективности современных методов лечения мужского бесплодия и возможности использования обогащенных клеточных культур» соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание

ученой степени доктора наук согласно п.п. 9-11, 13-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 № 842 (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации), а сам автор Охоботов Дмитрий Александрович достоин присуждения искомой ученой степени доктора медицинских наук по специальности: 3.1.13 Урология и андрология (Медицинские науки).

Доктор медицинских наук, профессор кафедры урологии и андрологии Медико-биологического университета инноваций и непрерывного образования, доцент. Руководитель центра урологии и андрологии ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. Главный внештатный уролог ФМБА России



Кызласов П.С.

Подпись д.м.н., доцента Кызласова Павла Сергеевича заверяю.

Ученый секретарь ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России
Заведующий научно-организационным отделом, к.м.н.

Голобородько Е.В.

«23» сентября 2023 года



Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России, 123098, Российская Федерация, г. Москва, улица Маршала Новикова, д. 23, тел.: +7 (498) 190-85-55, fmbc@fmbamail.ru