

На правах рукописи

ОХОБОТОВ

Дмитрий Александрович

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ЛЕЧЕНИЯ
МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ И ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ОБОГАЩЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР**

3.1.13. Урология и андрология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Барнаул – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Научный консультант:

Камалов Армаис Альбертович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

Официальные оппоненты:

Кызласов Павел Сергеевич – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России; Центр урологии и андрологии ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, руководитель; кафедра урологии и андрологии Медико-биологического университета инноваций и непрерывного образования, доцент

Епифанова Майя Владимировна – доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра урологии и оперативной нефрологии с курсом онкоурологии Медицинского института РУДН, доцент

Евдокимов Валерий Васильевич – доктор медицинских наук, Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, отдел андрологии и репродукции человека, главный научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Минздрава Российской Федерации

Защита состоится «___» июня 2023 года в ___ часов на заседании диссертационного совета 21.2.001.02 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (656038, Российская Федерация, Алтайский край, г. Барнаул, проспект Ленина, д. 40).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО АГМУ МЗ РФ (656038, Российская Федерация, Алтайский край, г. Барнаул, проспект Ленина, д. 40) и на сайте по адресу: <http://dissovet@agmu.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2023 года.

И/о ученого секретаря
диссертационного совета 21.2.001.02,
доктор медицинских наук

Дударева Юлия Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Мужское бесплодие является актуальной проблемой, распространенной по всему миру. Согласно данным Европейских клинических рекомендаций в мире бесплодна каждая 6 пара, а каждая пятая испытывает затруднение с наступлением спонтанной беременности (EAU, 2021), причем в общей структуре бесплодия на роль мужского фактора приходится до 50% (Божедомов В.А., 2021). Структура мужского бесплодия достаточно обширна и полиэтиологична, часто зависит от среды обитания, образа пищеварения, качества жизни и психосоматической отягощенности, которые часто работают по принципу синдрома взаимного отягощения. Несмотря на то, что, появившиеся в последние годы, работы посвященные генетическим, иммунным, эндокринным и другим формам инфертильности, позволили снизить общее количество идиопатических форм с 70,1 до 31,4% (EAU Guidelines, 2010-2021), эффективная специализированная терапия отсутствует. Существующие биологические активные добавки решают проблему патоспермии очень условно, а эффективность вспомогательных репродуктивных технологий (ЭКО-ИКСИ), не превышает 30-35%.

Регенеративная медицина – это раздел медицины, базирующийся на стыке клинической и теоретической науки, который сосредоточен на разработке и применении новых методов в лечении тканей и органов, восстановлении их функций, утраченных из-за болезней, дефектов или повреждений, или естественных процессов в рамках старения организма. В настоящее время отечественной и зарубежной наукой накоплен значительный опыт по использованию обогащенных клеточных культур различных видов в лечении инфертильности в ксеногенных, аллогенных и аутологичных вариантах, но общей концепции использования и адаптации этих технологий в клиническую медицину практически нет. В публикуемых материалах сообщается о результатах экспериментальных исследований на животных моделях, а клинические наблюдения представлены единичными случаями. При этом отсутствует системный и единый подход к использованию обогащенных клеточных культур, единые стандарты протоколов изготовления, методики введения и исследования, в том числе контроля реакций организма человека на подобную терапию, которые описаны очень условно.

Изучение возможностей регенеративной медицины при лечении мужской инфертильности, в лечении мужского бесплодия, а также оценка их безопасности и эффективности позволит разработать персонализированный подход в урологической и андрологической практике, найти возможность помощи пациентам с самыми тяжелыми нарушениями сперматогенеза, что обуславливает высокую актуальность изучения выбранной темы.

Степень разработанности темы исследования

Опираясь на собственные работы (Охоботов Д.А. с соавт, 2007-2021), а также на работы отечественных и зарубежных авторов, в работе изучалась эффективность, а также вопросы биологической и клинической безопасности методов лечения мужской

фертильности с помощью обогащенных клеточных культур и их продуктов. Для выполнения одной из главных задач исследования, были проанализированы результаты лечения 292 пациентов с мужским фактором бесплодия и клинически здоровыми партнершами. Полученные данные позволили сделать предположение о том, что имеющиеся в арсенале репродуктолога методы лечения мужской инфертильности в настоящее время обладают сомнительной эффективностью, а использование вспомогательных репродуктивных технологий, у пар с мужским фактором, к сожалению, обладает 25-35% эффективностью на 1 попытку ЭКО-ИКСИ. Предложенный метод лечения инфертильности у мужчин с помощью обогащенных клеточных культур и их продуктов, был основан на анализе результатов экспериментальных исследований 20 групп животных (мыши, крысы, кролики, всего 164 животных), которым проводились трансплантации обогащенных культур костного мозга, жировой ткани, клеток плаценты и пуповины, клеток тестикулярной ткани, фетальных клеток, клеток, полученных от старых и молодых животных, в ксеногенном, аллогенном и аутологичном вариантах. Полученные данные позволили сделать важный вывод о том, что стволовые клетки способны дифференцироваться в условиях клеточной ниши и крайне уязвимы к внешним управляющим сигналам, поэтому опасны для клинического применения, в то время как альтернативно разрабатываемые клеточные продукты, представляющие собой белковые фракции, продуцируемые этими клетками и состоящие из факторов роста, цитокинов и хемокинов (клеточный секрет), дают сходный клинический результат, но при этом более стабильны и предсказуемы, а, следовательно, более безопасны. На основании полученных данных был запатентован новый препарат для стимуляции сперматогенеза, созданный на основе клеточных продуктов и в настоящее время проводится первая фаза клинических испытаний. Полученные результаты подтверждают то, что уже при нынешнем уровне развития науки, технологии, использующие возможности регенеративной медицины способны компенсировать повреждения сперматогенеза у мужчин.

Таким образом, тема настоящей диссертационной работы представляется высоконаучной и может быть применена в репродуктологии, на базе клиник мужского и репродуктивного здоровья и исследовательских центров, но существует целый ряд спорных вопросов, касающихся различных клинических аспектов регенерации поврежденных тканей яичка, путем имплантации культур, обогащенных стволовыми и прогениторными клетками, а также их факторами роста, которые затрудняют клиническую практику и являются основанием для выбора научной темы.

Цель исследования

Улучшение результативности терапии пациентов с мужским бесплодием различной этиологии и разработка альтернативных современных методов лечения с помощью терапии стволовыми клетками и продуктами их секреции.

Задачи исследования

1. Проанализировать эффективность консервативной терапии и вспомогательных репродуктивных технологий в лечении мужской инфертильности в зависимости от этиологических факторов, вызвавших нарушения сперматогенеза.

2. Определить группы риска на основе анализа неудачных исходов лечения с учетом возможностей консервативной терапии и вспомогательных репродуктивных технологий, у пациентов, имеющих различные факторы, провоцирующие инфертильность.
3. В экспериментальных исследованиях на животных моделях провести сравнительное исследование эффективности трансплантации культур стволовых/прогениторных клеток, выделенных из различных тканей, на восстановление нарушенного сперматогенеза, гормонального фона и фертильности животных.
4. Определить наиболее эффективные варианты проведения терапии обогащенными клеточными культурами.
5. Оценить возможность восстановления поврежденного сперматогенеза кондиционированными средами с секретом мезенхимальных стволовых/прогениторных клеток жировой ткани (МСК ЖТ) в сравнении с трансплантацией обогащенных клеточных культур МСК ЖТ.
6. Провести анализ прогностической значимости метода терапии обогащенными клеточными культурами и кондиционированных сред с факторами роста мезенхимальных клеток жировой ткани по совокупным возможностям преодоления мужского бесплодия.

Научная новизна исследования

Впервые проведена оценка эффективности полного цикла лечения инфертильности у пар с мужским фактором инфертильности. Проанализированы неудачи и дан процентный прогноз на получение беременности в паре, где мужчины имеют то или иное заболевание, в том числе воспалительных заболеваний простаты (патент РФ № RU2408378C2 «Способ лечения хронического простатита»), нарушающее процессы сперматогенеза и фертильность.

Впервые дана комплексная сравнительная оценка эффективности терапии культурами, обогащенными стволовыми и прогениторными клетками в различных тканеспецифичных вариантах и сочетаниях (патент РФ № RU2653779C1 «Способ стимуляции сперматогенеза»). Проведен ряд сравнительных анализов по изучению эффективности методов клеточной терапии на животных моделях. Подтверждена клинически значимая эффективность и превосходство билатеральной подкапсульной терапии культурами в ксеногенном, аллогенном и аутологичном вариантах над монолатеральной, доказана разница в клинической эффективности использования культур, полученных от старых и молодых животных, исследован клинический эффект использования культур, полученных из плаценты и пуповины человека и их влияние на восстановление нарушенного сперматогенеза, гормонального фона и фертильности животных. Определена минимальная терапевтическая клеточная доза, которая обуславливает эффективность терапии, для различных видов культур. Проведен комплексный иммуногистохимический маркерный анализ тканей реципиентов с исследованием активности стволовости, функциональной активности, дифференцировки и пролиферации стволовых клеток до и после экспериментальной

терапии клеточными культурами. Исследовано влияние различных индукторов клеточной дифференцировки и изучено их влияние на качество восстановления сперматогенеза.

Впервые продемонстрирована безопасность использования кондиционированных сред с секретом культур стволовых/прогениторных клеток, выделенных из мезенхимальных клеток жировой ткани, и их возможности по восстановлению нарушенного сперматогенеза и гормонального фона у животных, в сравнении с использованием этой же клеточной культуры и контролем (патент РФ № RU2652902C1 «Способ стимуляции сперматогенеза»).

Теоретическая и практическая значимость работы

1. Проведен комплексный анализ качества и эффективности восстановления сперматогенеза и фертильности в эксперименте, с помощью культур, обогащенных стволовыми/прогениторными клетками в ксеногенном, аллогенном и аутологичном вариантах на животной модели двухстороннего абдоминального крипторхизма.
2. Определена минимальная терапевтическая доза клеток для эффективного восстановления сперматогенеза, для культур различных видов и происхождения.
3. Подтверждена эффективность подкапсульного введения культур, обогащенных стволовыми/прогениторными клетками различного происхождения.
4. Разработана методология всех компонентов и этапов терапевтического цикла, проверка фактора билатеральности введения и иммуногистохимический маркерный анализ всех этапов клеточной дифференцировки.
5. Проведена оценка сравнительной эффективности лечения различных форм мужской инфертильности.
6. Проведен анализ и выявлены корреляции взаимной факторной отягощенности и их влияния на успешность восстановления сперматогенеза.
7. Проведены исследования восстановления функции сперматогенного эпителия кондиционированными средами с факторами роста (секретомом) мезенхимальных стволовых и прогениторных клеток жировой ткани на крипторхической модели.
8. На основе секрета стволовых и прогениторных мезенхимальных клеток жировой ткани человека создан стимулирующий препарат, который в настоящее время проходит 1 фазу клинических испытаний.

Методология и методы исследования

В рамках данной диссертационной работы проведены четыре доклинических экспериментальных исследования на животных моделях и 2 клинических нерандомизированных, неконтролируемых, открытых, проспективных исследования, которые соответствуют правилам Good Laboratory Practice (GLP) и Good Clinical Practice (GCP) соответственно. Исследования направлены на проверку главных выдвинутых гипотез о том, что: во-первых, что экспериментальные возможности трансплантации стволовых и прогениторных клеток потенциально способны стимулировать регенеративные процессы в тестикулярной ткани и способны восстанавливать образование сперматозоидов в яичках, во-вторых препараты ,

созданные на основе секрета клеточных культур обладают стимулирующим сперматогенез действием, сравнимым с обогащенными клеточными культурами, но более безопасны по сравнению с ними. В представленной диссертационной работе использовались экспериментальные теоретические методы исследования (моделирование, эксперимент, анализ, логический, гипотетический), эмпирические методы исследования (наблюдение, фотографирование, измерение, сравнение, морфологические методы исследования), теоретические методы исследования (изучение, обобщение, анализ, сравнение).

Положения, выносимые на защиту

1. Современные методы преодоления infertility у пар с мужским фактором, с учетом возможностей ВРТ успешны в 45,9%, причем эффективность существенно различается и зависит от клинической формы нарушений сперматогенеза, основной провоцирующей причины и одновременного сочетания нескольких провоцирующих факторов, которые усугубляют клиническую картину заболевания.
2. С учетом возможностей ВРТ наиболее неблагоприятный прогноз использования классической терапии определен для пациентов с наследственным и воспалительным (в том числе специфическим) факторами, при которых риск неудач превышает 60%, при стойкой тератозооспермии (риск до 70,2%) и азооспермии (риск до 81,4%) а также с одновременным сочетанием более 2 отягощающих факторов, где эффективность терапии не превышает 13,6%, причем при использовании методов ВРТ риск неудач достигает 93,6%.
3. Экспериментальная интратестикулярная трансплантация культур, обогащенных стволовыми / прогениторными клетками в различных комбинациях тканевой совместимости является перспективным направлением для дальнейшего изучения, так как способствует частичному восстановлению нарушенного сперматогенеза и фертильности на животных моделях по сравнению с контролем, восстанавливая фертильность в ксеногенном варианте до 58% от исходных показателей, в аллогенном – до 25%, а в аутологичном – до 41,6%.
4. Учитывая то, что исследуемые культуры стволовых/прогениторных клеток, полученные из разных тканей, в различных вариантах гистосовместимости (ксеногенный, аллогенный или аутологичный) обладает примерно одинаковой эффективностью, максимальный репарационный эффект может быть получен у культур, полученных из тканей плодов или новорожденных, вводимых в оба яичка в дозе не менее 500 000 клеток на каждый орган.
5. Терапия продуктами секреции стволовых клеток оказывает эффект, сопоставимый с терапевтическим действием самих клеточных культур в отношении восстановления нарушенного сперматогенеза и фертильности.

Внедрение результатов работы в практику

Результаты клинической части работы основаны на анализе результатов лечения 292 мужчин (28,8% от общего количества исследуемых пар) с мужским фактором бесплодия и здоровыми женами, проходивших лечение на кафедре урологии и андрологии ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова, Университетской клиники

МНОЦ МГУ им. М.В.Ломоносова, клиники репродуктивного здоровья «Дети из пробирки» (г. Москва) и клиники репродуктивного здоровья «9 месяцев» (Московская область, г. Жуковский), за период с 2010 по 2017 годы. Методики диагностики, лечения нарушений сперматогенеза и фертильности, основанные на результатах работы, а также анализ результатов технологий ВРТ, используемых в клиниках, позволили добиться успеха в 45,89% случаев. Результаты работы успешно внедрены и используются в клинической практике в данных учреждениях.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Статистическую обработку полученных результатов выполняли на персональном компьютере с использованием программного обеспечения STATISTICA12. Перед проведением анализа и выбором статистических критериев проверку на соответствие выборок нормальному закону распределения проводили с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Вилка. В случае анализа данных при нормальном распределении переменные оценивали с учетом средней арифметической ряда (M) и стандартного квадратичного отклонения (σ). Дополнительно для оценки достоверности различий зависимых выборок был использован t-критерий для зависимых выборок. При анализе распределения значений переменных, не соответствующих нормальному, полученные данные представлены на диаграммах и в таблицах в виде медианы (Me) и 25-го и 75-го процентиля ($Q1$ и $Q3$ соответственно). Для анализа достоверности различий зависимых выборок был применён критерий Вилкоксона, для независимых выборок – критерий Манна-Уитни. Оценка статистической достоверности различий между качественными переменными проводилась с использованием χ^2 Пирсона или, при необходимости, точного критерия Фишера. При уровне значимости $p \leq 0,05$ различия считали достоверными (статистически значимыми).

Результаты работы доложены на VI, VII, XI, XII, XIII, XIV, XVI, XVII и XVIII Конгрессах «Мужское здоровье» с международным участием (Москва, 2010, 2020; Ростов-на-Дону, 2011; Сочи, 2015, 2018, 2021, 2022; Казань, 2016; Кисловодск, 2017); пленуме Российского общества урологов (Москва, 2013); IV научно-практической конференции «Фундаментальная и практическая урология» (Москва, 2015); IV съезде детских урологов – андрологов (2015); XVI Всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов (2016); на конгрессе Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – Asia Pacific Meeting (TERMIS-AP 2016), Tamsui Township (Тайвань (Китай), 2016); на конференции StemCellBio 2016 (Санкт-Петербург, 2016); Парк отель Кранкино, (Зеленоград, 2016); Сеченовском Международном Биомедицинском Саммите 2017 (СМБС-2017) (Москва, 2017); XIII Съезде и XVII конгрессе Российского общества урологов (РОУ) (2017); III национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2017); XX Конгрессе Российского общества урологов. Online (Москва, 2020).

Апробация диссертационной работы проведена на совместном заседании сотрудников отдела урологии и андрологии ОП Медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», и кафедры урологии и андрологии Факультета

Фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», протокол № 2, от 21 февраля 2021 года, а также на расширенном заседании проблемной комиссии хирургического профиля ФБГОУ ВО Алтайского ГМУ МЗ РФ, № 1, от 5 декабря 2022 года.

Соответствие диссертации заявленной специальности

Диссертация «Оценка эффективности современных методов лечения мужского бесплодия и возможности использования обогащенных клеточных культур» соответствует паспорту специальности 3.1.13. Урология и андрология, и областям исследования: пункту 1 – Изучению этиологии, патогенеза и распространенности урологических и андрологических заболеваний, в частности мужского бесплодия, а также пункту 3 – Экспериментальная и клиническая разработка методов лечения урологических и андрологических заболеваний и внедрение их в клиническую практику.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 76 печатных работ, из которых 28 в изданиях, из списка, рекомендованного ВАК Минобрнауки России РФ. Получено 3 патента РФ: патент РФ № RU2408378C2 «Способ лечения хронического простатита»), патент РФ №. RU2653779C1 «Способ стимуляции сперматогенеза» и патент РФ RU2652902C1 «Способ стимуляции сперматогенеза».

Личный вклад автора

Автором лично разработан дизайн исследования, сформирована цель и задачи, написал литературный обзор. Автором лично проведено обследование и лечение всех 554 мужчин имеющих мужской фактор infertility. Автором проведен системный анализ эффективности современных методов лечения мужской infertility, проанализированы неудачи терапии, выполнена статистическая обработка полученных результатов с помощью программного обеспечения STATISTICA 12.

На экспериментальном этапе автором лично сформировано состояние двухстороннего абдоминального крипторхизма у экспериментальных животных, проведены трансплантации обогащенных клеточных культур различных видов (всего 14 серий, 576 оперативных вмешательств на животных) и кондиционированных сред, вводимых интратестикулярно (6 серий, более 60 операций) на животных моделях абдоминального крипторхизма, а также токсического повреждения сперматогенеза, на цисплатиновой и доксорубициновой моделях.

Объем и структура работы

Диссертация 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.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материал и методы исследования

Методология работы

Диссертационная работа состоит из 2 этапов: клинической и экспериментальной. В клинической части приведены данные обследования 1 012 супружеских пар, проведена оценка выраженности мужского фактора бесплодия, подробно разобраны причины infertility. Для анализа результатов коррекции сперматогенеза и оценки эффективности процедур ВРТ, нами были отобраны 292 мужчины (28,8%) с преобладающим фактором infertility и здоровыми женами. В отдельную группу были выделены 96 пациентов с идиопатическими формами infertility (32,87%), распространенность которых была выше, чем в общей группе мужчин с нарушением фертильности (17,32%). Таким образом, общее количество пациентов рандомизированных в исследовательскую группу составило 196 человек (19,36%) от общего количества обследованных пар.

Пациентам с нарушениями спермограммы проведено 1-3 курса лечения, стимулирующего сперматогенез (витамины, микроэлементы, ферменты, антиоксиданты и т.д.). Те пациенты, у которых после 1 года интенсивной терапии в паре добиться беременности не удалось были в дальнейшем проведены по протоколу ЭКО (ИКСИ), не более 2 протоколов, где фиксировался факт наступления или отсутствия беременности. Суммарный период наблюдения за парами составил от 9 до 14 месяцев. Для оценки выраженности иммунного фактора проводился MAR-тест, для выявления числа сперматозоидов, которые могут быть покрыты антиспермальными телами (АСАТ). При наличии сперматозоидов с антителами проводилось соответствующее лечение. При необходимости, обследуемым пациентам назначались дополнительные методы диагностики. Проводилось обследование мазков из уретры методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на предмет выявления специфических возбудителей (хламидии, уреаплазмы и т.д.). Некоторым пациентам проводилось исследование уровня половых гормонов (общий тестостерон, ГСПГ, пролактин, ФСГ, ЛГ, ТТГ, ингибин В, антимюллеров гормон). Использовалось ультразвуковое исследование органов мошонки, мочевого пузыря, предстательной железы, семенных пузырьков, для определения структурных изменений и обнаружения аномалий в придатках, яичках и предстательной железе. При подозрении на ретроградное семяизвержение проводилось посткоитальное исследование анализа мочи для выявления сперматозоидов. Некоторым пациентам дополнительно в лаборатории сперматологии клиники кафедры клинической андрологии ФПК МР ФГБОУ ВПО «Российского Университета Дружбы Народов» (г. Москва) проводилось исследование уровня активных форм кислорода (ROS), а также исследование активности апоптоза сперматозоидов. Ряду пациентов при подозрении на генетически обусловленную совместимость проводилось кариотипирование и обследование в ФГБНУ Медико-генетическом научном центре имени академика Н.П. Бочкова (г. Москва). В процессе наблюдения была выявлена группа пациентов, у которых интенсивное лечение и участие в 2 протоколах ЭКО (ИКСИ) к успеху не привело.

Протокол вспомогательных репродуктивных технологий ЭКО (ИКСИ) проводился по стандарту, в соответствии с Приказом Минздрава России от 30.08.2012 № 107н (ред. от 11.06.2015) «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению». В процессе подготовки проводилась генетическая диагностика для определения риска развития генетических заболеваний. Стимуляция развития ооцитов в яичниках гормонами проводилась в плановом порядке гормональными препаратами (кlostилбегит и т.д). Пунктирование фолликулов и сбор эякулята осуществлялись согласно протоколу. Ввиду возможного высокого риска развития наследственных заболеваний у некоторых пар проводилось предимплантационная генетическая диагностика эмбриона ЭКО. Для подтверждения наступившей беременности через 1 неделю проводилось обследование уровня хорионического гонадотропина.

Анализ причин и результаты оценки эффективности, а также анализ неудач подробно освещен в соответствующем разделе. Для обоснования возможного применения альтернативных методов лечения в работу был включен экспериментальный раздел.

Вторая часть работы посвящена экспериментальному лечению искусственно созданной инфертильности на крысиной модели двухстороннего абдоминального крипторхизма. Проведено моделирование двухстороннего абдоминального крипторхизма, выполнена экспозиция на разных сроках фиксации яичек в брюшной полости, при низведении яичек в мошонку выполнялось введение различных видов культур, обогащенных стволовыми и прогениторными клетками под белочную оболочку. Результаты экспериментального лечения изложены в соответствующих главах. Проведено сравнительное экспериментальное исследование по изучению клинических возможностей интратестикулярного введения кондиционированных сред с факторами роста стволовых и прогениторных мезенхимальных клеток жировой ткани, полученных из клеточной библиотеки, созданной на основе 30 образцов жировой ткани здоровых мужчин. При анализе результатов было выявлено, что используемые кондиционированные среды с факторами роста стволовых и прогениторных клеток жировой ткани дают сравнимый с обогащенными клеточными культурами эффект, но более предсказуемы и безопасны, что обусловило возможность создания препарата для регенерации сперматогенного эпителия на основе секрета мезенхимальных клеток жировой ткани и возможность клинической апробации.

Экспериментальное исследование было разделено *на 4 этапа:*

На 1 этапе осуществлялось исследование изначальной фертильности у экспериментальных животных, которая была определена путем случайной выборки и подсадки 25% животных к самкам и выявления факта наличия беременности у самок и родов, причем, все 100 % животных были изначально фертильными. *Во время проведения 2 этапа* животным выполнялась операция по формированию двухстороннего абдоминального крипторхизма, по модели Дендеберова–Кирпатовского, с экспозицией семенников крыс и мышей в течение 21 суток, после чего производилось низведение яичек в мошонку, с одновременным введением

культуральной взвеси того или иного вида, и с последующим контролем теми или иными методами, описанными далее. *Во время проведения 3 этапа* части животных проводилась оценка фертильности специально выделенной части животных, которым не проводились контрольные методы исследования второго этапа. *На 4 этапе* животным выполнялись дополнительные эксперименты, которые не были связаны с методами контроля 2 и 3 фаз. Изучались особенности клинического действия культур и кондиционированных сред на основе секрета МСК ЖТ на животных моделях с проведением иммуногистохимического маркерного анализа.

Методы исследования, применяемые в работе

Метод определения фертильности: Определение фертильности в экспериментальных популяциях осуществлялось путем исключения части животных из каждой группы, включая контрольную, и их подсадки к самкам, из расчета 1 самец на 3-4 самки. Сроки определения фертильности у экспериментальных животных определялись из расчета полного цикла развития сперматозоида у крыс (35 суток) и срока беременности у крысы 22-24 дня (Ковалевский, 1951).

Расчет индекса фертильности: рассчитывается как произведение количества беременных самок (%) к среднему количеству крысят в группе и деленное на общее количество самцов в группе. Соответственно, чем выше индекс, тем более выражена фертильность у экспериментальных животных в группе (Камалов и соавт., 2008). Данный индекс оказался удобным параметром оценки половой силы у оперированных животных.

Метод экспериментальной хирургии: использовалась модель абдоминальной формы двухстороннего крипторхизма, описанная в диссертационной работе Е.С. Дендеберовым (1993), в модификации В.И. Кирпатовского (2008-2010), заключающаяся в мобилизации яичек у животных лапаротомным доступом и фиксации их лигатурами (5/0, 6/0) в районе латеральных боковых каналов. Время экспозиции яичка в мошонке в группах, которые подвергались оперативной деятельности, составило 21 сутки.

Метод исследования уровня гормонов: сбор крови осуществлялся путем косоного купирования кончика хвоста у крысы и собирания выделяющейся крови в пластиковую пробирку, содержащую гель, объемом 4 мл. Для контроля за герминогенной функцией семенников использовался мониторинг общего тестостерона и ЛГ. Для контроля за функциональной активностью сперматогенного эпителия использовалось изучение уровней ФСГ и Ингибина Б. Для определения общего уровня тестостерона, а также гонадотропных гормонов использовался иммунохемилюминисцентный метод исследования гормонального профиля, на иммунохимическом анализаторе Access 2, фирмы Beckman Coulter (USA). Уровень Ингибина Б определялся иммуноферментным методом (набор производства фирмы DSL, США).

Гистологические исследования: использовалась стандартная методика парафиновых срезов. Полученные микропрепараты окрашивались гематоксилином – эозином. Для электронной микроскопии препараты фиксировались в 10% растворе глутарового альдегида и далее велись по стандартной проводке.

Метод оценки индекса сперматогенеза: диагностика гипосперматогенеза и атрофии сперматогенных клеток яичка проводилась по методу А.Ф. Астраханцева и А.А. Соловьева (2003), путем подсчета сустентоцитов на 30 строго поперечных срезах семенных канальцев гистологического препарата, с помощью микроскопа «Биолан» - P11 (ЛОМО), при общем увеличении оптической системы $\times 420,0$. Затем производились подсчет общего количества сперматогенных клеток и расчет индекса сперматогенеза, как соотношение сустентоциты / клетки сперматогенной ткани.

Метод оценки популяции клеток Лейдига: популяция клеток Лейдига оценивалась при гистологическом анализе и подсчете индекса сперматогенеза по Астраханцеву–Соловьеву в межканальцевых локусах путем визуального наблюдения и прямого подсчета в 5 наиболее крупных локусах и определением среднего количества клеток на 1 препарат.

Метод экспериментальной клеточной терапии: терапия осуществлялась инсулиновым шприцем, путем постепенного проведения иглы параллельно капсуле яичка в 2 этапа. Введение первой порции содержимого инсулинового шприца, объемом 30%, осуществлялось медленным введением непосредственно после прокола капсулы яичка и разворота иглы параллельно капсуле и далее, после возникновения эффекта гидропрепаровки, остальные 70% клеточной взвеси, когда игла введена параллельно капсуле на всю длину. Перфорационное отверстие зашивается цветной синей маркировочной нерастворимой лигатурой Prolene (7/0) для маркирования. После завершения трансплантации яичко низводится в мошонку, с соблюдением мер предосторожности. После выполнения аналогичной трансплантации, с другой стороны, послеоперационная рана зашивалась.

Выделение, культивирование и обогащение клеточных культур: в работе исследовались культуры, полученные из биоматериалов человека, крыс и мышей, которые после всех этапов подготовки использовали для экспериментальной терапии культурами, обогащенными стволовыми и прогениторными стволовыми клетками. Общая характеристика культур дана в таблице 1.

Таблица 1 – Общая характеристика исследуемых культур

Крысы линий Wistar и Campbell		
Номер серии	Серия	Кол-во животных
Ксеногенные культуры		
1	Культура человеческих мезенхимальных клеток	10
2	Культура человеческих клеток фетального яичка	10
3	Культура клеток человеческого костного мозга	10
4	Культура клеток плаценты человека	15
5	Культура клеток пуповины человека	15
6	Культура клеток яичка мышей линии C-57 Black/6, несущих ген GFP	10
7	Культура клеток висцеральной жировой ткани мышей линии C-57 Black/6, несущих ген GFP	10
7а	Культура МСК жировой ткани человека	12

Продолжение таблицы 1

Крысы линий Wistar и Campbell		
Номер серии	Серия	Кол-во животных
Аллогенные культуры		
8	Обогащенная культура клеток яичка взрослой крысы линии Wistar	10
9	Обогащенная культура клеток яичка новорожденной крысы линии Wistar	10
Аутологичная культура		
10	Культура яичка взрослых крыс линии Campbell	10
Культуры для оценки специфичности маркеров и миграции трансплантированных клеток		
Крысы линий Wistar и Campbell		
11	Культура клеток яичка трансгенных мышей, несущих ген GFP	4
12	Культура стромы жировой ткани трансгенных мышей, несущих ген GFP	4
Мыши линии C57 Black/6 с введенным трансгеном GFP		
13	Культура клеток яичка трансгенных мышей, несущих ген GFP	4
14	Культура стромы жировой ткани трансгенных мышей, несущих ген GFP	4
Сравнительная оценка эффективности обогащенных клеточных культур и кондиционированных сред с факторами роста		
15	Контроль (1-я серия)	5
16	КС доза 1 (2-я серия)	8
17	КС доза 2 (3-я серия)	6
18	DMEM-LG (4-я серия)	6
19	Гель+МСК ЖТ (5-я серия)	6
20	МСК ЖТ (6 серия)	6

Стволовые и прогениторные клетки получали из плодов человека 16 недель гестации, полученных в лицензированных медицинских учреждениях, действующих в рамках законодательства РФ (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 3 декабря 2007 г. № 736 «Об утверждении перечня медицинских показателей для искусственного прерывания беременности»).

Мезенхимальные стволовые клетки получали из костного мозга средой DMEM содержащей 2 mM ЭДТА в качестве антикоагулянта. Затем суспензию клеток наслаивали на раствор фикола-урографина (плотность 1,077 г/мл) и центрифуговали 30 мин при 2000 g. Отбирали фракцию мононуклеарных клеток на границе раздела фаз, ресуспендировали в среде и повторно центрифуговали 5 мин при 1500g. Полученный осадок ресуспендировали в полной питательной среде (DMEM и F-12 (в соотношении 1:1) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 0,02% гентамицина) и хранили не более суток до момента использования при температуре 4 °С.

Культуру стволовых и прогениторных клеток фетального яичка получали от плодов 16 недель гестации. Культивировали в стандартных пластиковых флаконах (75 см², Corning, USA) при 37 °С в атмосфере с 5% CO₂ в среде DMEM/F-12 (в соотношении 1:1) с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка (FCS),

эпидермального ростового фактора (ЭФР) – 20нг/мл. Культивирование проводили адгезивно, смену среды проводили каждые 3-5 сутки, при достижении клетками монослоя, пассировали. Культуру перинатального яичка крыс Wistar и Campbell получали из новорожденных крысят первого дня жизни. Для этого крысят забивали после предварительной дачи эфирного наркоза методом цервикальной дислокации. В стерильных условиях вскрывали брюшную полость, извлекали яички, отделяли от соединительной ткани, фаций и клетчатки и измельчали в среде DMEM/F-12, содержащей стрптомицин и пенициллин в качестве антибиотиков и антимикотик фунгизон. После получения фрагментов размером 1 мм² к суспензии клеток добавляли клостридиальную коллагеназу до концентрации 0,2%, инкубировали на шейкере при температуре 37 °С в условиях атмосферы, содержащей 6% CO₂. Затем к культуре добавляли фетальную сыворотку до концентрации 3%, тщательно перемешивали на Вортексе и центрифугировали в течение 15 минут при температуре 18 °С со скоростью 1100 оборотов в минуту на центрифуге Эппендорф. Затем декантировали среду и ресуспендировали полученный осадок в среде DMEM/F-12, содержащей антибиотики и 5% фетальной сыворотки. Суспензию вновь центрифугировали и ресуспендировали, таким образом, удаляя остатки коллагеназы из суспензии. Стерильно отбирали аликвоту, содержащую клетки, окрашивали раствором, содержащим пропидий йодид и акридиновый оранжевый, подсчитывали количество клеток и их жизнеспособность. Культуру яичка взрослых крыс получали аналогично, яичко извлекали из мошонки предварительно декапитированных крыс в стерильных условиях, удаляли оболочку, ткань измельчали ножницами на фрагменты размером 1 мм, обрабатывали коллагеназой, инкубировали, отмывали и подсчитывали, как описано выше.

Для оценки специфичности маркеров были получены культуры стромы яичка и жировой ткани трансгенных мышей линии C57 Black/6 для дальнейшей терапии мышам линии C57 Black/6 без введенного трансгена, у которых был сформирован двухсторонний абдоминальный крипторхизм. Все клетки трансгенной линии C57 Black/6 с введенным трансгеном GFP вырабатывают белок GFP, который при люминисцентной микроскопии окрашен в ярко зеленый цвет и является удобным маркером для выявления трансплантатов, оценки их жизнеспособности *in vivo*, распространения по тканям и органам и времени жизни трансплантата.

Культуры для оценки специфичности маркеров получали следующим способом. После орхфуникулэктомии, под эфирным наркозом, удаленное яичко в стерильных условиях отмывали десятикратно средой, содержащей RPMI16/40, 5% бычьей фетальной сыворотки, гентамицин, фунгизон, глютамин, пируват натрия. Затем ткань яичка расстригали ножницами в чашке Петри с той же средой на фрагменты диаметром 1-5 мм. Затем суспензию отмывали средой того же состава, центрифугировали при 900 оборотах/минуту в течение 15 минут. Осадок переносили в среду того же состава с добавлением 0,2 % клостридиальной коллагеназы 4 типа. Инкубировали при 37 °С, при постоянном перемешивании. Суспензию фильтровали через стерильный капроновый фильтр, удаляя крупные фрагменты. Полученную суспензию центрифугировали при 950 оборотах / минуту – 15 минут. Осадок ресуспендировали в среде, содержащей RPMI16/40, 20% бычьей фетальной сыворотки, гентамицин, фунгизон, глютамин, пируват натрия, меркаптоэтанол из

расчета 500 000/мл в атмосфере, содержащей 6% CO₂ при 37 °С. Обогащение культур шло путем 4-5 пассирований в стандартных культуральных флаконах, на среде NEPEs, в CO-инкубаторе.

Качественная и количественная оценка, транспортировка и хранение обогащенных клеточных культур: для трансплантации экспериментальным животным использовали культуру клеток 3-его пассажа, сравнительная жизнеспособность культур, определенная по трипановому синему. Подсчет трансплантируемого клеточного материала осуществлялся в модифицированной камере Горяева, путем подсчета количества клеток в 1 ряду, с последующим умножением на количество рядов в штриховой сетке. При перерасчете на объем культуральной среды получали приблизительное количество элементов клеточной популяции в культуре. Транспортировка осуществлялась при температуре человеческого тела в пластиковой пробирке, объемом 10 мл, в специальной культуральной среде, состоящей из среды RPMI 1640, фетальной телячьей сыворотки, NEPEs, раствора гипоксантин-аминопротерин-тимидина (НАТ), аминокислот и витаминов. Культуры хранили в среде, содержащей 85% FCS и 15% диметилсульфоксида в сосудах Дьюара, содержащих жидкий азот. При размораживании жизнеспособность клеток составляла 83-96%

Подготовка клеточных культур к экспериментальной терапии: полученные клеточные культуры центрифугировались при 1 000 оборотов в минуту на центрифуге в течение 10 минут. После появления клеточного центрифугата, культуральная среда экстрагировалась. К центрифугату добавлялся 0,9% раствор NaCl, из расчета 5-6 мкл на 1 животное. После механического растворения клеточного центрифугата в растворе NaCl, лабораторной пипеткой с механическим дозатором, клеточная культура помещалась в пробирки-эппендорфы в равном количестве. В каждом эппендорфе оказывалось приблизительно одинаковое количество культуральной массы, что достигалось путем нескольких путей нескольких аспирационных смешиваний с помощью пипетки. Далее культуральная взвесь, в количестве 0,5-0,6 мл собиралась инсулиновым шприцем. Для каждой пробирки был подготовлен свой инсулиновый шприц, по количеству подготовленных животных. При трансплантации культуральная взвесь из одного шприца вводилась в яички экспериментального животного, из расчета 0,3-0,35 мл на 1 яичко, что контролировалось с помощью делений инсулинового шприца.

Идентификация и контроля выживаемости клеточных культур в тканях реципиента: для оценки выживаемости клеточных культур и изучения путей их возможной миграции была использована система моноклональных антител к ряду биохимических красителей (таблица 2).

Таблица 2 – Белки маркерного анализа культур, использованных в работе

Название маркера	Исследуемый процесс
Oct-4	Оценка «стволовости» трансплантированных культур
Dazl	Оценка трансформации ССК
Stella	Оценка дифференцировки ССК

Продолжение таблицы 2

Название маркера	Исследуемый процесс
DDX	Оценка дифференцировки ССК
N – кадгерин	Оценка продукции прогениторных клеток из ССК
Актин	Оценка активности межклеточного контактного взаимодействия
Нестин	Дополнительный маркер дифференцировки стволовых клеток
BrdU	Для обнаружения пролиферирующих клеток в живых тканях
Hoehst 3344	Ядерный краситель для оценки неспецифической пролиферативной активности

Окраска препаратов на маркеры сперматогенных стволовых клеток ССК проводилась после орхфуникулэктомий, приготовления препаратов, сушки и изучалась при хемилюминисцентной темнопольной микроскопии на инфертированном микроскопе, оснащенный специальными фильтрами.

Иммуноморфологические исследования: исследуемые ткани и культуры клеток фиксировали метанолом в течение 20 минут и хранили при температуре – 20 °С в 10% растворе формалина не позднее 2-х часов после их получения от животных. В дальнейшем образцы хранили при – 70 °С. Готовили тонкие 10-15 мкм серийные срезы и монтировали на стекле. На срезах или флаконах с фиксированным монослоем клеток проводили реакцию непрямой иммунофлюоресценции по следующей схеме: на срез, высушенный под ламинарным потоком воздуха, наносили 20 мкл раствора моноклональных антител на отмывочном буфере. Инкубировали стекла в течение часа при комнатной температуре во влажной камере. Отмывали несвязавшиеся антитела 3 раза, погружая их в свежий раствор отмывочного буфера на 10 минут. Наслаивали на срез конъюгат кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, меченных флуоресцеином (SERVA), предварительно обработанным печеночным порошком человека и отцентрифугированным при 15 тыс G в течение 30 минут. Инкубировали и отмывали стекла как описано выше. Реакцию учитывали под флуоресцентным микроскопом и фотографировали.

Определение контрольных сроков фертильности: контрольные сроки были определены следующим образом. Фертильность определялась в сроки 90-120 суток. Исходя из того, что цикл развития сперматозоида крысы и мыши – 35 суток, а срок беременности у крыс – 22-24 дня, причем факт беременности удается установить иногда за 2-3 дня до родов (итого: 1-2 срока развития сперматозоида + 2 срока беременности у крыс).

Выделение, культивирование и приготовление препарата МСК из жировой ткани человека: МСК выделяли из подкожного жирового отложения здоровых доноров обоих полов, полученного при проведении малого хирургического вмешательства под местной анестезией или в ходе плановых хирургических операций. Полученный в результате операции биоматериал в стерильных условиях ламинарного бокса измельчали сосудистыми ножницами до консистенции суспензии мелких (размером не более 2 мм³) кусочков и смешивали с растворами ферментов коллагеназы I типа (200 ед/мл, «Worthington Biochemical», США) и диспазы (40 ед/мл,

«Sigma», Германия) при соотношении объема ткани (в мл) к объему ферментативного раствора (в мл) 1:2. Образец инкубировали при 37 °С в течение 30-45 мин при постоянном встряхивании. По окончании инкубации добавляли равный объем среды роста МСК и центрифугировали при 200 g в течение 8 мин. Белесый поверхностный слой, состоящий из зрелых адипоцитов и кусочков ферментативно необработанной ткани, удаляли с помощью вакуумного насоса, а осадок, состоящий из клеток стромы жировой ткани и клеток сосудистой стенки и крови, суспендировали в стерильной деионизованной воде для лизирования эритроцитов. Чтобы восстановить осмотическое давление, добавляли соответствующий объем 10-кратного фосфатного буфера, а затем фильтровали через нейлоновые фильтры с размером пор 100 мкм («BD FalconCellStrainer», США) и центрифугировали при 200 g 5 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в среде, поддерживающей рост недифференцированных мезенхимных прогениторных клеток человека (Advance Stem Cell Basal Medium, далее – AdvanceSM, «HyClone», США), содержащей 10% смеси факторов роста (Advance Stem Cell Growth Supplement, «HyClone») и 100 Ед/мл пенициллина/стрептомицина («HyClone»). Выделенные клетки высаживали на чашки Петри («Corning», США) в концентрации $5 \times 10^4 / \text{см}^3$ и инкубировали в CO_2 – инкубаторе (5% CO_2 ; 95% воздуха) при 37 °С. На следующий день в чашках меняли среду для удаления не прикрепившихся клеток. Смену среды проводили каждые 2-3 дня; при достижении 70-80% конfluence клетки рассаживали в соотношении 1:3 с использованием раствора QTase (HyClone). Жизнеспособность клеток оценивали путем окраски клеток раствором трипанового синего и подсчета количества живых и мертвых клеток с помощью счетчика клеток (Cell Counter, «Invitrogen», США).

Для введения крысам часть МСК ЖТ 4 пассажа открепляли от поверхности пластика с использованием раствора QTase (HyClone), подсчитывали их количество и разводили в среде DMEM-LG в концентрации 250 тыс. кл. на 100 мкл среды либо смешивали с 1% бычьим коллагеновым гелем в соотношении 1:1 по объему («ИМТЕК», Россия). Полученную суспензию клеток или смесь клеток с коллагеновым гелем использовали для введения в соответствующих экспериментальных группах.

Получение кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК ЖТ человека: для получения кондиционированной среды МСК ЖТ 4-5 пассажа, достигшие 80% конfluence, промывали трехкратно раствором Хэнкса («ПанЭко», Россия). К чашкам добавляли среду DMEM-LG. Клетки культивировали в течение 7 дней, после чего кондиционированную среду собирали, очищали от клеточного дебриса путем центрифугирования в течение 10 мин при 300g, при необходимости концентрировали в 25 раз с помощью ультрафильтрации через мембраны из регенерированной целлюлозы с указанным отсечением 10 кДа в центрифужных картриджах («Millipore», США).

Подготовка биоматериала на основе кондиционированной среды (КС), содержащей продукты секреции МСК ЖТ человека, и коллагенового геля: все процедуры проводили в ламинарном шкафу II уровня биологической защиты с соблюдением правил асептики, сохраняя все компоненты при температуре 4 °С.

В стерильные 1,5 мл пробирки вносили по 50 мкл 2,5% бычьего коллагенового геля («ИМТЕК», Россия). Затем к гелю добавляли либо 50 мкл неконцентрированной КС МСК ЖТ (для группы «КС МСК ЖТ доза 1»), либо 30 мкл раствора фибронектина (1 мг/мл, «ИМТЕК», Россия) и 20 мкл концентрированной в 25 раз КС МСК ЖТ (для группы «КС МСК ЖТ доза 2»). В качестве отрицательного контроля 50 мкл 2,5% бычьего коллагенового геля смешивали с 30 мкл раствора фибронектина (1 мг/мл, «ИМТЕК», Россия) и 20 мкл среды DMEM-LG. После добавления всех нужных компонентов пробирки быстро перемешивали вортиксированием, центрифугировали в течение минуты и набирали смесь в стерильный инсулиновый шприц. Полученный биоматериал хранили при температуре 4 °С, не допуская полимеризации геля, и использовали для введения в течение 30 минут.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническая характеристика мужчин с инфертильностью

При обследовании 1 012 супружеских пар у 76 пар (7,5%) выявить причину ненаступления беременности несмотря на весь комплекс проведенных обследований согласно стандартным протоколам, выявить не удалось. Нарушения спермограммы были выявлены у 554 мужчин (54,7%), а женский фактор инфертильности у 644 женщин (63,6%), причем 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%).

Для достоверности оценки результатов коррекции сперматогенеза и эффективности процедур ВРТ, нами были отобраны 292 мужчин (28,8%) с преобладающим фактором инфертильности и здоровыми женами. В отдельную группу были выделены 96 пациентов с идиопатическими формами инфертильности (32,87%), распространенность которых была выше, чем в общей группе мужчин с нарушением фертильности (17,32%). В общей группе хронический простатит был выявлен в 50,0% случаев, инфекции, передающиеся половым путем, выявлялись у 120 пациентов (61,2%), а варикоцеле было обнаружено у 42 пациентов (21,4%). В исследуемых группах встречались пациенты с эндокринным фактором бесплодия (n=12; 6,12%).

Обращает на себя внимание то, что у большого количества инфертильных пациентов причин, обуславливающих бесплодие одновременно было несколько. Явную причину инфертильности имели 37,6% пациентов (n=88). У пациентов с крипторхизмом, одновременно присутствовали эндокринный и воспалительный факторы инфертильности, у пациентов с варикоцеле встречались инфекции, передающиеся половым путем (ИППП) и т.д. У пациентов с идиопатической формой инфертильности также встречались все варианты изменения спермограммы.

Таким образом у 88 пациентов был выявлен 1 провоцирующий фактор (30,1%), у 94 пациентов – 2 фактора (32,1%) и у 110 пациентов (37,6%) более двух факторов (таблица 3).

Таблица 3 – Эффективность лечения в исследуемых группах пациентов с infertility (абс., %)

Когорты пациентов	n, %	Беременности (абс., %)		
		после курсов лечения	после 1 ICSI	после 2 ICSI
ИППП	120 (41,09%)	13 (10,8%)	27 (22,5%)*	40 (33,3%)**/**
Хронический простатит	98 (33,5%)	9 (9,18%)	14 (14,2%)*	32 (32,6%)**/**
Варикоцеле	42 (14,3%)	7 (16,6%)	17 (40,5%)*	21 (50,0%)**
Крипторхизм	10 (3,42%)	2 (20,0%)	3 (30,0%)*	7 (70,0%)**/**
Аномалии и опухоли	9 (3,08%)	–	2 (22,2%)	6 (66,6%)**
Иммунологический фактор (АСАТ и HLA конфликт)	23 (7,87%)	2 (8,7%)	6 (26,0%)*	12 (52,1%)**/**
Генетический фактор	21 (7,19%)	–	3 (14,2%)	5 (23,8%)**
Идиопатические факторы	96 (32,8%)	7 (7,3%)	28 (29,1%)*	41 (42,7%)**/**
Эндокринный фактор	12 (4,1%)	–	2 (16,6%)	5 (41,6%)**
Тератозооспермия	58 (19,8%)	5 (5,61%)	13 (22,4%)*	22 (37,9%)**/**
Азооспермия	27 (9,24%)	–	2 (7,4%)	5 (18,5%)**
Фактическое количество беременностей	–	37 (12,6%)	78 (26,7%)*	134 (45,89%) **/**
Примечание – * – достоверность различий между 1 и 2 контрольными точками ($p \leq 0,05$); ** – достоверность различий между 1 и 3 контрольными точками ($p \leq 0,05$); *** – достоверность различий между 2 и 3 контрольными точками ($p \leq 0,05$).				

Таким образом, согласно данным таблиц 4 и 5 выявлено, что стимулирующая терапия позволила восстановить нормальную картину сперматогенеза у 126 пациентов (43,1%), что говорит о ее существенной клинической значимости. Кроме этого на ее фоне удалось зафиксировать 37 беременностей (12,6%), что также свидетельствует о эффективности ее использования при восстановлении фертильности бесплодных пациентов. После первого цикла ЭКО была выявлена 41 беременность, после второго цикла еще 56 (всего $n=97$, 37,7%). Таким образом, удалось добиться всего 134 беременностей в исследуемых супружеских парах (45,89%) infertility по мужскому фактору, а эффективность 1 попытки ЭКО (ICSI) в среднем составила 21,08%, что является средним показателем для 1 попытки такого метода лечения бесплодия пар с мужским фактором.

Снижение количества сперматозоидов категорий А+В было выявлено у 94 пациентов (32,1%), причем чем больше провоцирующих факторов было выявлено, тем достоверно чаще встречалась астенизация сперматозоидов. Тератоспермия была выявлена у 74 пациентов (25,3%) и для нее была характерна та же закономерность, что и для параметра астенизации. Интересно что из 74 пациентов, 33 (44,5%) относились к когорте представленной идиопатическими формами infertility. Азооспермия встретилась у 27 пациентов, причем 15 (55,5%) из них находились в когорте с идиопатическими формами.

Таблица 4 – Спермиологическая картина пациентов в зависимости от количества провоцирующих инфертильность факторов (абс., %)

Формула эякулята пациентов (n=292)	Количество n (%)	1 фактор n (%)	2 фактора n (%)	Более 2 факторов n (%)
Нормозооспермия	39 (13,3%)	26 (66,6%)	9 (23,07%)	4 (10,2%)
Олигозооспермия	58 (19,8%)	23 (39,6%)	19 (32,7%)	16 (27,5%)
Астенозооспермия	94 (32,1%)	15 (15,9%)	32 (34,04%)	47 (50,0%)
Тератозооспермия	74 (25,3%)	16 (21,6%)	27 (36,4%)	31 (41,8%)
Азооспермия	27 (9,24%)	8 (29,6%)	7 (25,9%)	12 (44,4%)
Итого	292	88 (30,1%)	94 (32,1%)	110 (37,6%)

Таблица 5 – Результаты лечения бесплодия в зависимости от сочетания факторов мужской инфертильности (абс., %)

Параметры	n, %	Факторы бесплодия		
		1 фактор	2 фактора	более 2-х факторов
Всего (пациентов)	292	88* (30,1%)	94** (32,1%)	110*** (37,6%)
Восстановление нормоспермии	126 (43,1%)	83* (94,3%)	28** (29,7%)	15*** (13,6%)
Беременности после стимуляции	37 (12,6%)	30* (34,0%)	6** (6,38%)	1*** (0,9%)
Беременности после двух циклов ЭКО	134 (45,89%)	74* (84,09%)	53** (56,3%)	7*** (6,36%)
Неудачи лечения	158 (54,1%)	14* (15,9%)	41** (43,6%)	103*** (93,6%)

Примечание – * – достоверность различий между общей группой и пациентами с 1 фактором ($p \leq 0,05$); ** – достоверность различий между общей группой и пациентами с 2 факторами ($p \leq 0,05$); *** – достоверность различий между общей группой и пациентами с наличием более 2 факторов ($p \leq 0,05$).

У 158 (54,1%) пациентов проводимая терапия оказалась неэффективной. Таким образом, у каждого второго пациента с мужским бесплодием современное высокотехнологичное и дорогостоящее лечение оказалось неэффективным.

Все случаи неудачного лечения мужской инфертильности в исследуемых когортах представлены на диаграмме 1.

Согласно полученным данным, наибольшее количество неудач приходится на когорты больных с генетическим и воспалительным факторами ($\geq 60,0\%$). Несмотря на успешное лечение инфекций передающихся половым путем, риск неудач достигает в этой группе 66,6%. Следует отметить, что в эту группу входят пациенты с одновременным сочетанием 2 или 3 сопутствующих факторов инфертильности и ИППП является лишь одним из сочетанных факторов.

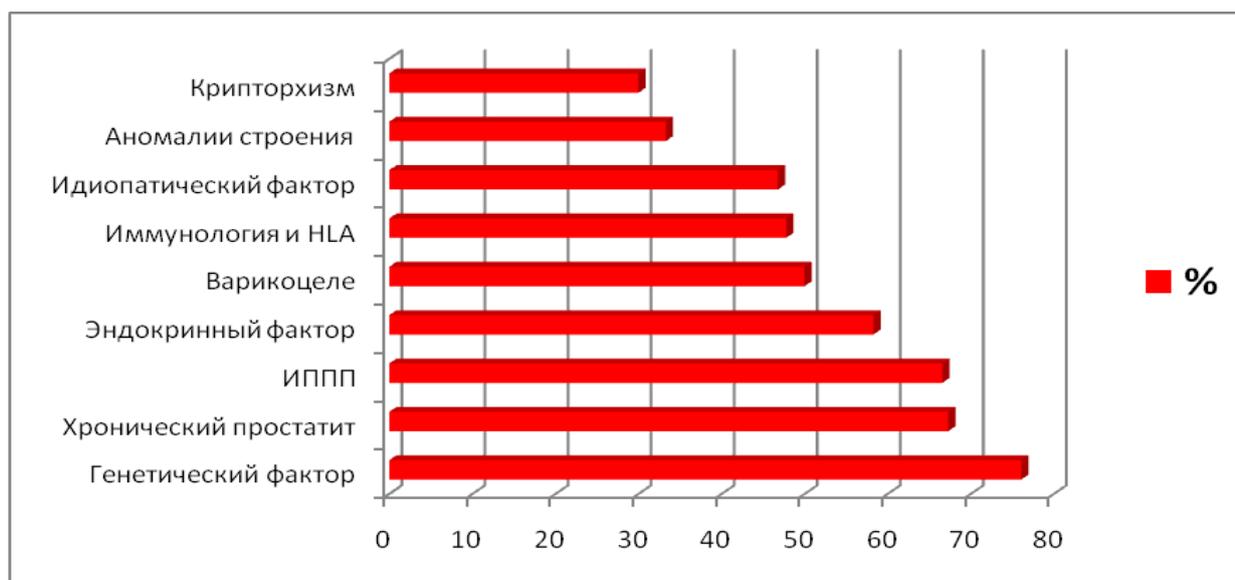


Диаграмма 1 – Неудачные результаты терапии в исследуемых группах (абс., %)

Риск неудачи у большинства пациентов варикоцеле, иммунными факторами, у пациентов с идиопатическими формами, а также с эндокринными расстройствами, особенно при одновременном сочетании нескольких факторов, которые в той или иной степени обеспечивают infertility составляет 46,8-58,3%. У пациентов с крипторхизмом и другими аномалиями строения органов репродуктивной системы риск неудач составляет 30-33,3% (таблица 6).

Таблица 6 – Спермиологическая картина у пациентов с неудачными результатами терапии (абс., %)

Спермиология	Мужской фактор n=292, %	Нет беременностей n=158, %	Неудачи (%)
Нормозооспермия	39 (13,3%)	4 (10,25%)	10,25%
Астенозооспермия	58 (19,8%)	29 (50,0%)	50,0%
Олигозооспермия	94 (32,1%)	51 (54,2%)	54,2%
Тератозооспермия	74 (25,3%)	52 (70,2%)	70,2%
Азооспермия	27 (9,24%)	22 (81,4%)	81,4%

У пациентов с нормальной спермиологической картиной, на фоне лечения сопутствующих заболеваний, общее количество неудач при лечении составило в среднем 10,25%, при астенозооспермии – 50,0%, при олигозооспермии 54,2%, при тератозооспермии – 70,2%, при азооспермии – 81,4%.

Экспериментальная терапия культурами, обогащенными стволовыми и прогениторными клетками ксеногенного происхождения

У животных всех экспериментальных групп ксеноварианта после устранения двухстороннего абдоминального крипторхизма разрешение гипергонадотропного гипогонадизма и биохимические профили гормонов достигали нормальных уровней

уже к 14 суткам. Восстановление концентраций ингибина Б к исходному уровню происходило к 90-120 суткам наблюдения. Подтверждено, что уровень ингибина Б тесно коррелирует с состоянием сперматогенного эпителия семенных канальцев. Восстановление сперматогенеза происходило во всех группах линейно, с разной интенсивностью и скоростью, но к 90-120 суткам наблюдения экспериментальные животные всех групп, кроме контрольной, имели полный цикл сперматогенеза, а отдельные особи в этих группах достигли показателя фертильности. Эти данные подтверждаются исследованиями гистологии тканей, состоянием популяции клеток Лейдига, измерениями индекса сперматогенеза и показателем фертильности. Прямых корреляций между видовым составом культуры и интенсивности репарации, а также качественным составом сперматогенеза у животных выявлено не было.

Наиболее продуктивным было восстановление сперматогенеза у группы животных, получавших в качестве терапии культуру клеток, обогащенных стволовыми и прогениторными клетками фетального яичка человека, причем коэффициент фертильности в этой группе был самым высоким – 4,74, а общее число беременностей в группе составило 58%. Наихудшие результаты получены в группе животных перенесших терапию «микст»-культурой клеток костного мозга, так как здесь удалось добиться только 1 беременности у 12 самок, соответственно коэффициент фертильности составил 0,75. В среднем в группах, перенесших ксеногенную терапию обогащенными клеточными культурами, частота возникновения беременностей составила 33,27%. При этом среднее число новорожденных крысят во всех группах, составило $2,69 \pm 0,64$ новорожденных в одном помете. Несмотря на то, что животных, давших потомство, можно считать фертильными, их репродуктивный потенциал (коэффициент фертильности) значительно снижен, фактически в 2,5 раза по сравнению со здоровыми животными. В группе контроля, которая использовалась для сравнения всех основных групп, ни одной беременности получено не было.

По данным иммуногистохимических исследований выявлено, что уже на ранних сроках наблюдения, канальцы, в которых активирован процесс прогениторной дифференцировки, демонстрируют активную прогениторную пролиферацию, и это коррелирует с данными гистологической картины семенников крыс, индексами сперматогенеза и уровнем половых гормонов.

Экспериментальная терапия культурами, обогащенными стволовыми и прогениторными клетками аллогенного происхождения

Восстановление сперматогенеза во всех группах алловарианта, также происходило с разной интенсивностью и скоростью, и к контрольным 90-120 суткам наблюдения экспериментальные животные, имели полный цикл сперматогенеза, что подтверждается исследованиями гистологии тканей, состоянием популяции клеток Лейдига, измерениями индекса сперматогенеза и показателем фертильности. Наиболее эффективным было восстановление сперматогенеза у группы животных, получавших в качестве терапии культуру клеток, обогащенных стволовыми и прогениторными клетками яичка новорожденной крысы линии Wistar. Коэффициент фертильности составил – 2,49, а общее число беременностей в группе составило 25%, в культуре

от взрослых животных – 1,25, частота возникновения беременностей составила 20,83%, среднее число новорожденных крысят во всех группах, составило $2,9 \pm 0,58$. Полученные данные подтверждаются иммуногистохимическими исследованиями, данными гормонального и морфологического контроля.

В контрольной группе, которая использовалась для сравнения всех основных групп, ни одной беременности к 120 суткам получено не было.

Терапия культурами, обогащенными стволовыми и прогениторными клетками аутологичного происхождения

У крыс линии Campbell восстановление уровней гонадотропинов и тестостерона к 14 суткам, что сходно с данными в группах ксеногенного и аллогенного вида экспериментальной клеточной терапии. Восстановление концентраций ингибина Б к исходному уровню происходило быстрее, чем в группах ксеногенного и аллогенного варианта, и восстановилось до исходного уровня уже к 90 суткам наблюдения. Важным фактором является то, что к 90 суткам наблюдения крысы линии Campbell, имели полный цикл сперматогенеза, а 75% всех крыс линии Campbell достигли показателя фертильности. Эти данные подтверждаются исследованиями гистологии тканей, измерениями индекса сперматогенеза и показателем фертильности. Беременность была получена у 5 самок из 12 (41,6%), что также является хорошим показателем (в ксеногенном варианте количество беременностей в группе составило 33,27%, в аллогенном – 20,83%). Количество новорожденных крысят в одном помете составило $3,6 \pm 0,54$ (для сравнения в ксеногенном варианте этот показатель составил $2,69 \pm 0,64$, а в аллогенном – $2,9 \pm 0,58$). Безусловно, что количество новорожденных в одном помете, ниже чем у здоровых животных (не меньше 7,0), но коэффициент фертильности в аллогенном варианте сравнительно высокий – 4,5 (для сравнения самый высокий коэффициент фертильности в ксеногенном варианте составил – 4,74, а в аллогенном варианте – 2,49). По данным иммуногистохимических исследований выявлено, что уже на ранних сроках наблюдения, каналцы, в которых активирован процесс прогениторной дифференцировки, демонстрируют активную прогениторную пролиферацию, и это коррелирует с данными гистологической картины семенников крыс, индексами сперматогенеза и уровнем половых гормонов. Эти результаты следует признать успешными, так как в группе контроля, которая использовалась для сравнения всех основных групп и клинических вариантов терапии, ни одной беременности получено не было.

Дополнительные эксперименты.

Исследование особенностей одностороннего и двухстороннего вариантов терапии культурами, обогащенными стволовыми и прогениторными клетками

В данном исследовании принимали участие 3 группы животных, перенесших экспериментальную терапию культурами обогащенными стволовыми и прогениторными клетками костного мозга человека, клетками фетального яичка человека и «микст» культурой мезенхимальных стволовых клеток человека.

При исследовании особенностей одностороннего и двухстороннего вариантов терапии культурами, обогащенными стволовыми и прогениторными клетками, выявлено, что билатеральная терапия значительно более эффективна у крыс, чем

моноорганная, что подтверждается данными гормонов крови, гистологическими исследованиями, исследованиями индекса сперматогенеза и фертильности, а животные перенесшие билатеральную терапию имеют в 3 раза больший репродуктивный потенциал (таблица 7).

Таблица 7 – Исследование фертильности после трансплантации стволовых и прогениторных клеток в зависимости от фактора моно и билатеральности

№	Название группы	Кол-во самок (1:4)	Количество беременностей в группе (абс./%)	Среднее число крысят в помете	Коэффициент фертильности в группе на 1 самца
1	Культура человеческих мезенхимальных клеток (Моно)	8	0,0/0,0%	0,0	0,0
2	Культура человеческих мезенхимальных клеток (Би)	8	1,0/12,5%	3,0	1,5
3	Культура человеческих клеток фетального яичка (Моно)	8	2,0/25,0%	2,5±2,1	2,5
4	Культура человеческих клеток фетального яичка (Би)	8	5,0/62,5%	2,8±0,83	7,0
5	Культура клеток человеческого костного мозга (Моно)	8	2,0/25,0 %	3,5±0,5	2,75
6	Культура клеток человеческого костного мозга (Би)	8	3,0/37,5%	3,0±1,73	4,5
Суммарные данные по группам Моно и Би					
7	Группы Моно	24	4,0/16,66%	2,0±1,8	1,33
8	Группы Би	24	9,0/37,5%	2,93±0,11	4,39

Определение минимальной терапевтической дозы у животных, получивших терапию культурами, обогащенными стволовыми и прогениторными клетками ксеногенного происхождения

В данном исследовании принимали участие 4 группы животных, перенесших экспериментальную терапию культурами клеток плаценты человека, клеток пуповины человека, а также клеток яичка мышей линии C-57 Black/6, несущих ген GFP и клеток висцеральной жировой ткани этих мышей. Для каждой дозы был определен пул животных в 5 крыс (таблица 8).

Таблица 8 – Исследование фертильности в дозозависимых группах

№	Название группы	Кол-во самок (1:4)	Количество беременностей в группе (абс./%)	Среднее число крысят в помете	Коэффициент фертильности в группе на 1 самца
1	Культура клеток плаценты человека 500 000 ЕД	8	2,0/25,0%	2,5±2,1	2,5

Продолжение таблицы 8

№	Название группы	Кол-во самок (1:4)	Количество беременностей в группе (абс./%)	Среднее число крысят в помете	Коэффициент фертильности в группе на 1 самца
2	Культура клеток плаценты человека 50 000 ЕД	8	1,0/12,5%	3,0	1,5
3	Культура клеток плаценты человека 5 000 ЕД	8	0,0/0,0%	0,0	0,0
4	Культура клеток пуповины человека 500 000 ЕД	8	4,0/50,0%	3,25±0,95	6,5
5	Культура клеток пуповины человека 50 000 ЕД	8	1,0/25,0 %	3,0	1,5
6	Культура клеток пуповины человека 5 000 ЕД	8	0,0/0,0 %	0,0	0,0
7	Культура клеток яичка мышей линии С-57 Black/6, несущих ген GFP 50 000 ЕД	8	4,0/50,0%	2,33±0,57	4,66
8	Культура клеток яичка мышей линии С-57 Black/6, несущих ген GFP 5 000 ЕД	8	0,0/0,0 %	0,0	0,0
9	Культура клеток висцеральной жировой ткани мышей линии С-57 Black/6, несущих ген GFP, 500 000 ЕД	8	3,0/37,5%	2,33±0,57	3,49
10	Культура клеток висцеральной жировой ткани мышей линии С-57 Black/6, несущих ген GFP, 50 000 ЕД	8	0,0/0,0 %	0,0	0,0
Суммарные данные по дозозависимым группам					
11	500 000 ЕД	24	9,0/37,5 %	2,69±0,48	4,035
12	50 000 ЕД	32	6,0/18,75%	2,08±1,42	1,56
13	5 000 ЕД	24	0,0/0,0 %	0,0	0,0

При исследовании индекса фертильности в дозозависимых группах было выявлено, что животные, получившие терапию культурами, обогащенными стволовыми и прогениторными клетками, в терапевтических дозах 500 000 ЕД и 50 000 ЕД в эксперименте дали потомство, которое было здоровым и фертильным. Животные, получившие терапию в дозе 5 000 ЕД остались инфертильными, несмотря на нормальный уровень половых гормонов и индекс сперматогенеза. Таким образом минимальной терапевтической дозой может считаться доз 50 000 ЕД, хотя частота наступления беременностей у самок в этих группах была в 2 раза ниже. Также следует отметить, что индекс фертильности в группах с дозой 500 000 ЕД был в 4 раза больший, чем в группе с дозой 50 000 ЕД, что свидетельствует о том, что наиболее оптимальной дозой для лечения бесплодия у крыс является доза 500 000 ЕД на 1 яичко. Увеличение терапевтической дозы более 500 000 ЕД на 1 яичко не имеет

смысла, так как даже при такой дозе фертильности достигали не более 57% экспериментальных животных.

Использование биоматериала на основе продуктов секреции мезенхимных стволовых клеток человека и коллагена для восстановления сперматогенеза на модели экспериментального крипторхизма

Оперативным путем была собрана коллекция из 30 образцов жировой ткани от здоровых доноров, из которых была создана клеточная библиотека МСК ЖТ. Проведен весь необходимый пул работ обеспечивающий защиту культур.

Экспериментальным путем были определены концентрации основных просперматогенных факторов роста, таких как VEGF, HGF, FGF2, Angpt-1, PEDF было выявлено, что наиболее оптимальный срок для набора оптимальных концентраций и получения секрета мезенхимальных стволовых и прогениторных клеток жировой ткани – 7 сутки культивирования.

Изменения концентраций этих белков представлены на рисунке 1, А-Г, концентрации в таблице 9.

При этом обнаружена статистически значимая обратная корреляция между концентрацией HGF и специфической активностью индивидуальных образцов биологически активного комплекса экстрацеллюлярных продуктов секреции МСК-ЖТ человека ($r=-0,65$; $p=0,022$) и тенденция к прямой корреляции между концентрацией FGF2 и специфической активностью индивидуальных образцов биологически активного комплекса экстрацеллюлярных продуктов секреции МСК-ЖТ человека ($r=0,46$; $p=0,12$).

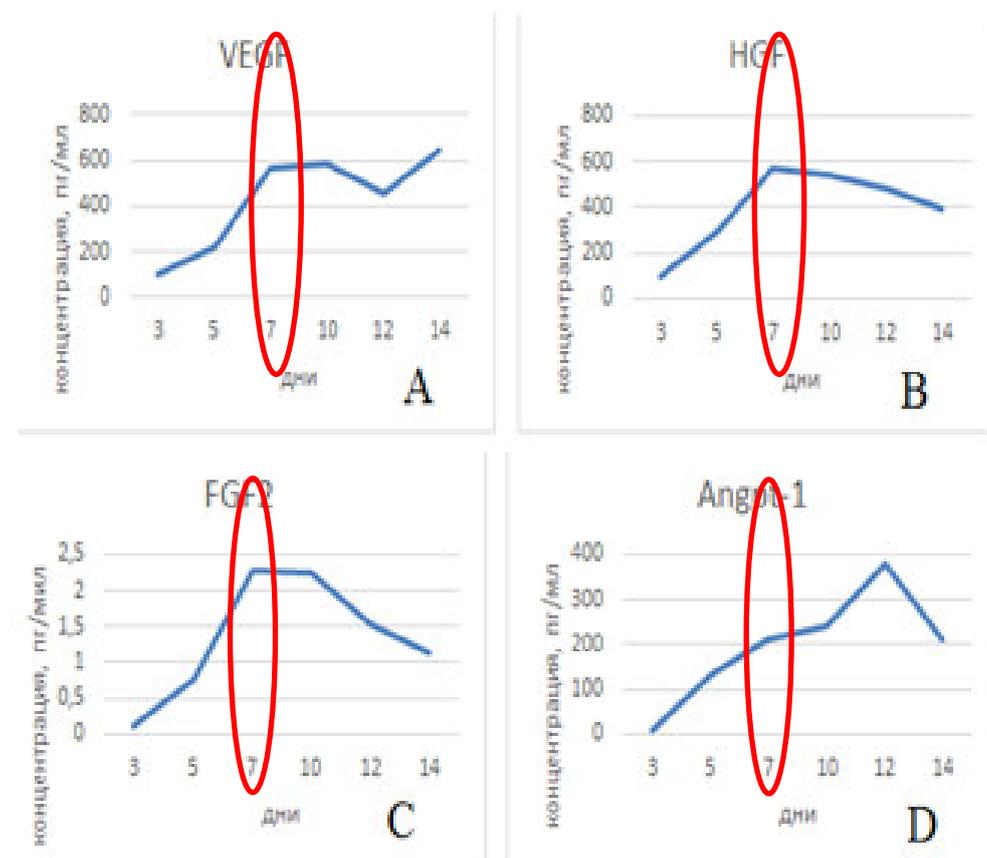


Рисунок 1 – Изменения концентраций основных просперматогенных факторов роста

Таблица 9 – Концентрации ключевых активных факторов при кондиционировании МСК-ЖТ в среде DMEM-LG на 7 сутки культивирования

Фактор	VEGF, пг/мл	HGF, пг/мл	FGF2, пг/мл	Angpt-1, пг/мл	PEDF, пг/мл
Среднее±SD	390,0±268,9	801,9±788,4	3,54±5,74	342,2±36,6	3067,4±2999,1
Медиана (25%, 75%)	283,6 (227,9; 431,5)	697,2 (207,4; 970,4)	1,78 (0,53; 4,16)	223,3 (107,9; 458,8)	2128,6 (1131; 2893,3)

Кроме того, обнаружены прямые корреляции концентраций VEGF ($r=0,84$; $p=0,004$) и FGF2 ($r=0,54$; $p=0,03$), а также соотношения VEGF/PEDF ($r=0,42$; $p=0,04$) со специфической активностью индивидуальных образцов. Полученные результаты сопоставимы с литературными данными.

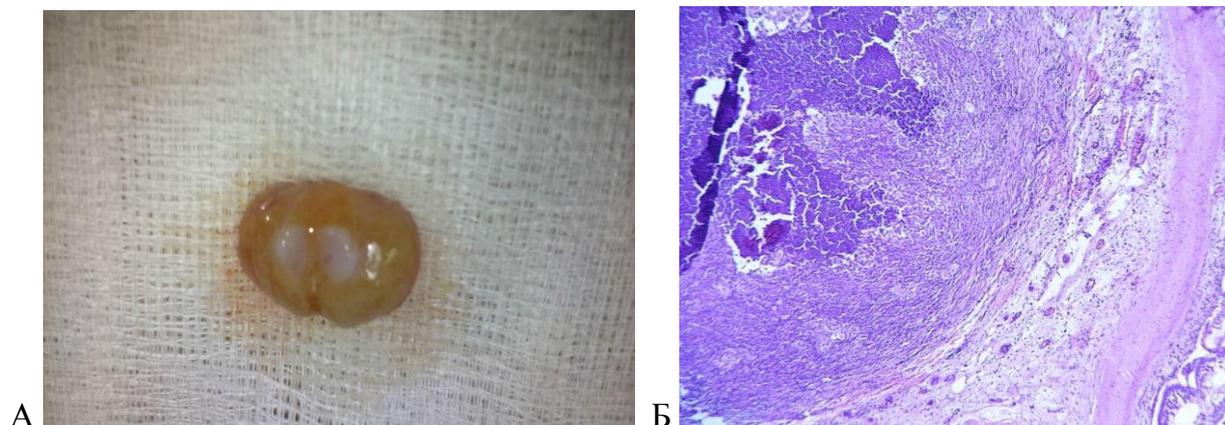
Проведено 6 серий опытов:

В 1-й серии яички после 2-недельного пребывания в брюшной полости низводили в мошонку без каких-либо лечебных мероприятий. Во 2-й серии перед низведением яичек под их белочную оболочку вводили 0,1 мл коллагенового геля, содержащего 50% кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК жировой ткани человека (МСК ЖТ) (КС доза 1). В 3-й серии перед низведением яичек вводили такой же объем коллагенового геля с концентрированной средой культивирования МСК ЖТ для выявления возможности усиления лечебного эффекта за счет более высоких концентраций факторов стимуляции регенерации, секретлируемых МСК (КС доза 2). В 4-й серии в яички вводили 0,1 мл смеси коллагенового геля и стандартной среды DMEM-LG, служащей основой для кондиционирования и суспендирования МСК ЖТ перед их смешиванием с коллагеновым гелем. Эта серия служила контролем. В 5-й серии в яички перед их низведением вводили коллагеновый гель, содержащий культуру МСК ЖТ (250 тыс.кл.). Цель этой серии опытов заключалась в сравнении выраженности биологического эффекта самих МСК ЖТ и продуктов их секреции. В 6-й серии вводили только изолированную культуру МСК ЖТ без коллагеновой основы (250 тыс.кл.), чтобы определить, насколько коллагеновый матрикс влияет на биологический эффект клеточной терапии.

При гистологической оценке состояния сперматогенеза через 1 месяц после ликвидации двухстороннего абдоминального крипторхизма было установлено, что в группе контрольных животных (1 серия) развивался блок сперматогенеза на уровне сперматогоний или сперматоцитов 1-го порядка (рисунок 2). В серии опытов с введением геля, содержащего неконцентрированную КС МСК ЖК, отмечалось некоторое улучшение сперматогенеза: темные сперматогонии А обнаружены во всех исследованных препаратах, но более зрелые клеточные формы встречались также редко или отсутствовали.

Значительное улучшение состояния яичка отмечено в сериях, где использовали коллагеновый гель с кондиционированной КС МСК и гель с МСК, а также при введении в яичко культуры МСК без гелевой основы. В этих опытах выявляли завершённый сперматогенез (до стадии сперматозоидов) или в части опытов (3-я серия) или во всех экспериментах (неповрежденные сегменты яичек в 5-й

серии и препаратах животных 6-й серии). В тех опытах, в которых вводили среду ДМЕМ (4-я серия), также отмечено некоторое улучшение сперматогенеза с развитием блока сперматогнеза на уровне сперматоцитов 1-го или 2-го порядка (таблица 10).



А – внешний вид; Б – гистологическая картина (гематоксилин и эозин, ув. $\times 200$).

Рисунок 2 – Гистиоцитарная гранулема в ткани крипторхированного яичка через 3 месяца после введения коллагенового геля с МСК ЖТ и низведения в мошонку

Таблица 10 – Частота выявления различных стадий созревания сперматозоидов в крипторхированных яичках через 1 месяц после их низведения (кол-во животных с признаком/кол-во животных в группе)

Серии	Сперматогонии А светлые	Сперматогонии А темные	Сперматогонии Б	Сперматоциты 1 порядка	Сперматоциты 2 порядка	Сперматозоиды
Контроль (1-я серия)	5/5	3/5	1/5	1/5	0	0
КС доза 1 (2-я серия)	8/8	8/8	2/8	0	0	0
КС доза 2 (3-я серия)	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6	2/6
ДМЕМ-LG (4-я серия)	6/6	6/6	6/6	3/6	1/6	0
Гель+МСК (5-я серия)	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
МСК (6 серия)	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6

В контрольной серии опытов выявляли значительное количество канальцев, полностью лишенных эпителиальной выстилки. Число пустых (атрофичных) канальцев в этой группе составило $63,24 \pm 5,16$ канальцев на единицу условной площади препарата. В серии с ДМЕМ их количество было примерно таким же – $64,26 \pm 3,15$. В то же время в опытах с введением геля с КС разных концентраций, геля с МСК и МСК количество атрофичных канальцев было значительно меньше – $7,28 \pm 0,26$, $3,18 \pm 0,24$, 0 и $34,11 \pm 0,15$ канальцев на единицу условной площади соответственно (таблица 11).

Таблица 11 – Количественная характеристика субпопуляции клеток сперматогенного эпителия через 1 месяц после низведения крипторхированных яичек (клеток в 1 мкм²)

Серии	Сперматогонии А светлые	Сперматогонии А темные	Сперматогонии Б	Сперматозиты 1 порядка	Сперматозиты 2 порядка	Сперматозоиды
Контроль (1-я серия)	1,62±0,08	1,04±0,06	0,34±0,4	0,37±0,4	0	0
КС доза 1 (2-я серия)	2,27±0,32	1,43±0,68	0,35±0,3	0	0	0
КС доза 2 (3-я серия)	23,72±1,12 ***	24,02±1,37 ***	20,59±0,81 ***	18,91±1,38 ***	10,52±1,04 ***	2,25±0,43 **
ДМЕМ-LG (4-я серия)	30,23±0,90 ***	22,92±1,24 ***	27,52±1,20 ***	15,17±1,26 ***	4,2±1,44	0
Гель+МСК (5-я серия)	25,67±0,67 ***	21,65±1,60 ***	14,58±0,36 ***	19,77±0,39 ***	12,81±0,99 ***	5,53±1,61 **
МСК (6 серия)	21,42±1,13 ***	19,08±1,58 ***	23,00±1,71 ***	18,06±2,04 ***	12,04±0,90 ***	6,42±0,64 ***
Примечание – статистическая значимость различий по сравнению с контролем: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.						

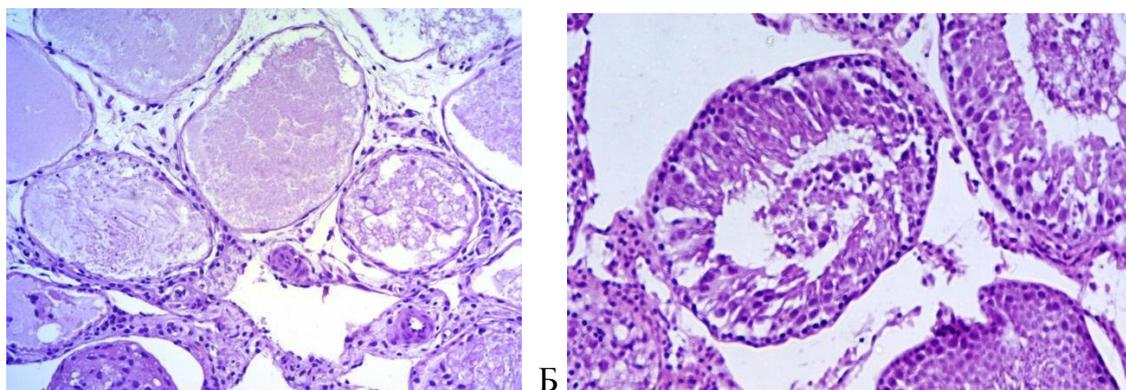
Через 3 месяца после низведения крипторхированных яичек во всех сериях отмечено улучшение сперматогенеза. Недифференцированные и малодифференцированные клеточные формы (светлые и темные сперматогонии А) практически полностью восстановились. Даже в контрольной серии в отдельных препаратах выявляли завершённый до стадии сперматозоидов сперматогенез, однако в большинстве случаев он был заблокирован на уровне сперматозитов 1-го и 2-го порядка (таблица 12). В сериях опытов с введением геля с неконцентрированной КС и ДМЕМ ситуация мало отличалась от контрольной серии. В то же время в опытах с концентрированной КС (доза 2) и МСК выявляли завершённый сперматогенез в большинстве (КС доз 2) или во всех (МСК) случаях. Серию с введением геля+МСК не анализировали в связи с выявлением в этих опытах гистиоцитарной гранулемы, что явилось дополнительным патологическим фактором (рисунок 3).

В связи с наличием гистиоцитарных гранул в препаратах у животных серии 5, выявленные единичные локальные очаги сперматогенеза, с блоком на различных уровнях на клиническую картину не влияли, и интерпретация результатов в этой серии была затруднена. Количество атрофичных канальцев через 3 месяца в контрольной серии существенно не изменилось по сравнению с предыдущим контролем (1 месяц), составив 75,26±6,17 канальцев на единицу условной площади препарата, так же, как и в опытах с ДМЕМ – 52,12±2,19.

Таблица 12 – Количественная характеристика субпопуляции клеток сперматогенного эпителия через 3 месяца после низведения крипторхированных яичек (клеток в 1 мкм²)

Серии	Сперматогонии А светлые	Сперматогонии А темные	Сперматогонии Б	Сперматозиты 1 порядка	Сперматозиты 2 порядка	Сперматозоиды
Контроль (1-я серия)	21,15±1,03	19,74±1,94	15,03±0,86	8,41±2,38	2,54±1,32	2,40±1,08
КС доза 1 (2-я серия)	19,81±1,80	15,65±1,05	20,59±0,69 **	9,16±0,98	9,61±1,94*	0
КС доза 2 (3-я серия)	23,36±1,49	23,68±1,35	20,51±1,21 *	14,81±0,98 *	12,17±1,63 **	5,14±1,21*
DMEM-LG (4-я серия)	28,24±1,39	27,95±1,58	27,65±1,32 ***	10,28±1,25	5,64±1,4	0
Гель+МСК (5-я серия)	–	–	–	–	–	–
МСК (6 серия)	21,49±0,54	23,92±1,19	20,28±1,94 *	16,17±2,24 *	11,49±1,38 **	6,98±1,17*

Примечание – статистическая значимость различий по сравнению с контролем: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.



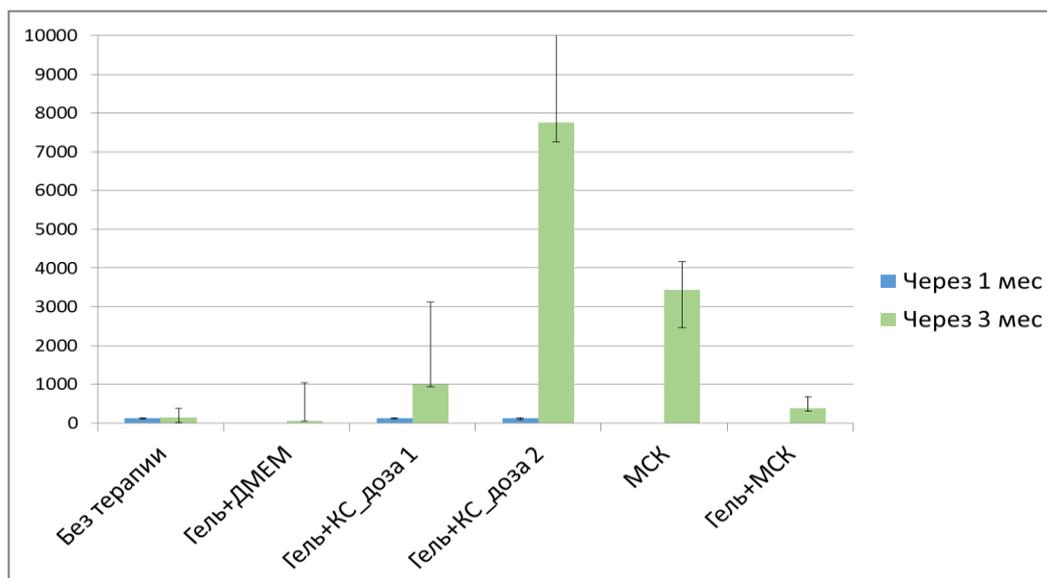
А – Атрофичные каналцы в крипторхированных яичках через 1 месяц после низведения (контрольная серия); Б – восстановление сперматогенного эпителия через 1 месяц после низведения с введением в яичко КС МСК ЖТ.

Рисунок 3 – Состояние сперматогенного эпителия семенных каналцев, через 1 месяц после использования терапии обогащенными клеточными культурами. Окраска гематоксилином и эозином, ув. ×200 и ×400 соответственно

В остальных сериях их количество продолжало уменьшаться, составив в серии гель+КС доза 1 0,03±0,01, КС доза 2 – 0,78±0,13 и МСК – 6,13±0,52 каналцев на единицу площади препарата.

Через 3 месяца после низведения крипторхированных яичек. При этом сроке наблюдения отмечено значительное возрастание как общего количества, так и подвижных сперматозоидов в сериях 2, 3 и 6, причем наибольший прирост этих показателей был получен в серии с использованием концентрированной КС (серия 3).

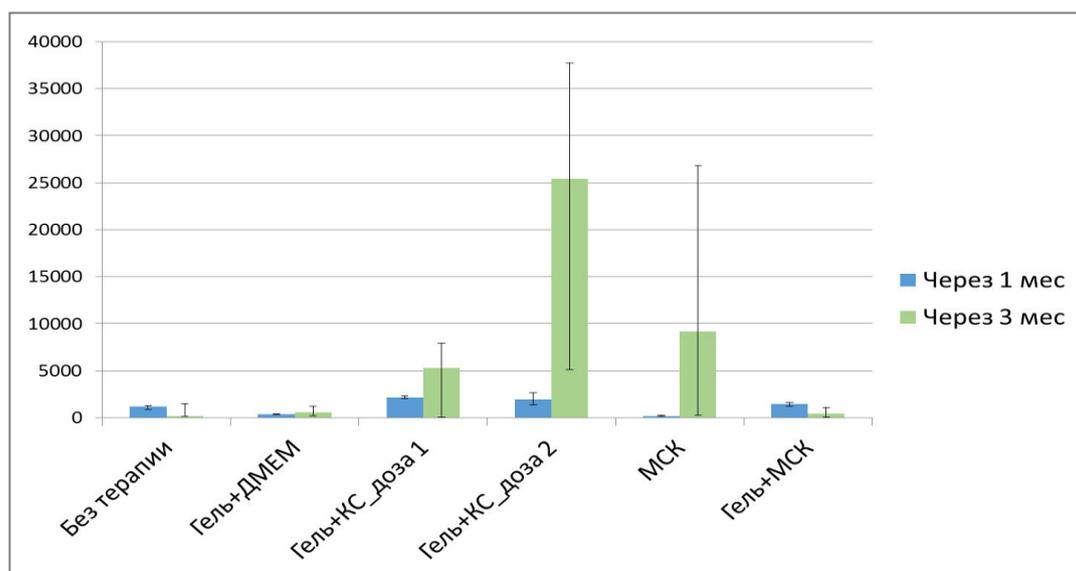
В серии 2 было отмечено увеличение общего количества сперматозоидов в среднем в 2,5 раза (с 2 126 до 5 259 тысяч), причем фракция подвижных клеток в этой популяции составляла в среднем 875 тысяч сперматозоидов, что составило 16,7% от общей фракции. Использование концентрированной КС с факторами роста на гелевой основе (серия 3) через 3 месяца после введения, увеличило общую популяцию сперматозоидов в среднем до 19 745 тысяч сперматозоидов, причем фракция подвижных сперматозоидов составила в среднем 36,7% (рисунки 4, 5).



* – $p < 0,05$ (при сравнении с группой контроля Гель+ДМЕМ).

Рисунок 4 – Общее количество, выделенных из придатка яичка в исследуемых группах (тыс. на 1 придаток).

Данные представлены в виде медиана (25-, 75-процентили)



* – $p < 0,05$ (при сравнении с группой контроля Гель+ДМЕМ).

Рисунок 5 – Количество подвижных сперматозоидов, выделенных из придатка яичка в исследуемых группах (тыс. на 1 придаток).

Данные представлены в виде медиана (25-, 75-процентили)

Использование факторов роста для стимуляции процессов заживления и регуляции ремоделирования тканей является активно развивающимся направлением регенеративной медицины. Большое значение для жизнедеятельности ССК имеют такие факторы как нейротрофический фактор из глиальных клеток (GDNF), основной фактор роста фибробластов (FGF-2), фактор ингибирования лейкемии (LIF) и другие (Oatley Jon M., Brinster Ralph L., 2008; Park M.H., 2016). Например, для активации процессов дифференцировки ССК требуется повышение секреции FGF-2 и GDNF, при подавлении фактора KITLG. В работах, посвященных восстановлению сперматогенеза, показано, что введение фактора роста эндотелия сосудов (VEGF165) на коллагеновом (гелевом) носителе не стимулирует образование семенных канальцев и новых кровеносных сосудов, однако приводит к увеличению количества канальцев, содержащих сперматогонии, что указывает на протективную роль VEGF по отношению к ССК (Dores C., Dobrinski I., 2014).

Введение под белочную оболочку яичек суспензии МСК ЖТ или кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК ЖТ, комбинированной с коллагеновым гелем, эффективно стимулирует процессы восстановления сперматогенеза на модели экспериментального крипторхизма. Максимальный эффект был отмечен на сроке наблюдения 3 месяца. Эти результаты коррелируют с нашими предыдущими данными, демонстрирующими, что на фоне экспериментального лечения нарушений сперматогенеза на модели двухстороннего абдоминального крипторхизма при использовании МСК происходит выраженная активация сперматогенного каскада, но показатель фертильности у этих животных можно оценивать не ранее 70 дня от начала наблюдения (Камалов А.А., Сухих Г.Т., 2010). При введении неконцентрированной КС МСК ЖТ, несмотря на уровневый блок, количество сперматозитов 2 порядка значительно превышало показатели в контрольных группах (без терапии и при введении геля+ДМЕМ) и было сравнимо с данными, полученными при введении концентрированной КС МСК ЖТ и самих клеток. Это может свидетельствовать о том, что неконцентрированная КС МСК ЖТ потенциально способна в дальнейшем выявить конечные формы сперматозоидов, но сроки репарации при этом могут быть значительно увеличены. Таким образом, концентрированная КС МСК ЖТ оказывает выраженное и клинически значимое стимулирующее действие на сперматогенез и чем выше концентрация, тем более выражен и статистически значим клинический ответ.

Следует отметить, что при введении МСК ЖТ в составе коллагенового геля у 50% экспериментальных животных через 3 месяца на фоне уменьшения массы яичек было выявлено наличие специфической гранулемы, вызывающей замещение семенных канальцев на фоне выраженной локальной ишемии ткани, которое, по всей видимости, связано с тем, что коллагеновый носитель сыграл роль своеобразной клеточной ниши для МСК, и после пространственной дезориентировки клеток репарационный потенциал МСК был переориентирован на формирование гранулематозной ткани. Даже у животных этой серии, у которых не развились гранулемы, через 3 месяца наблюдения было выявлено, что большинство семенных канальцев характеризовалось малым количеством клеток Сертоли, а также

признаками атрофии и склероза, что может свидетельствовать о блокаде стимулирующего эффекта у дезориентированной в пространстве культуры МСК. Поэтому введение МСК ЖТ в составе коллагенового геля не привело к положительным изменениям в течение 3 месяцев наблюдения, в то время как использование МСК без коллагена демонстрировало стабильный хороший клинический эффект.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование культур, обогащенных мезенхимальными стволовыми и прогениторными клетками аутологичного происхождения в приведенных выше примерах позволило, либо компенсировать, либо частично устранить мужской фактор infertility в сложных клинических ситуациях. Использование клеток аутологичной природы снижает вероятность появления непредсказуемых эффектов клеточной терапии, а также вирусную и прионную нагрузку, так как используется биоматериал реципиента. Осложнений инфекционного профиля в данных наблюдениях выявлено не было, что может быть объяснено как техническими особенностями, так и иммунопривилегированностью и иммуносупрессией в данном органе.

В результате проведенного цикла работ было выявлено, что более перспективно к адаптации в клиническую практику, направление исследований, касающееся использования не самих стволовых и прогениторных клеток, а их факторов роста. При этом, контроль управляемости процессов локальной репарации функций сперматогенного эпителия более очевиден, а сам процесс метаболизма ростовых факторов в тестикулярной ткани неоднократно описан, предсказуем и плотно зависит от регулирующих внешних сигналов, что исключает вероятность неконтролируемого атипичного роста, к которому склонны стволовые клетки особенно в условиях внешнего экранирования. Использование кондиционированных сред с факторами роста позволяет решить множество этических, правовых, биологических и медицинских проблем, значительно осложняющих перспективу клинического использования клеточных культур при лечении мужского бесплодия, терапия факторами роста стволовых и прогениторных клеток подобные нюансы исключает.

На основании проведенных доклинических испытаний был синтезирован препарат «Медирег» на основе кондиционированных сред, обогащенных факторами роста мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани, на коллагеновом носителе, который прошел все фазы доклинических испытаний и в настоящее время находится на стадии регистрации первой фазы клинических испытаний.

Таким образом, несмотря на то, что проведенные эксперименты не позволяют сегодня со 100% уверенностью рекомендовать их для клинического применения при лечении infertility у мужчин, отдельные направления, в частности использование факторов роста МСК, являются более перспективными для успешного клинического внедрения, что является определяющим для дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. Современная эмпирическая терапия мужской инфертильности, включающая возможности вспомогательных репродуктивных технологий, позволяет получить беременность у пар с подтвержденным мужским фактором различной этиологии в 45,9% случаев.
2. Наиболее неблагоприятный прогноз получения беременности у пар, где нарушения сперматогенеза обусловлены наличием наследственных и воспалительных факторов (более 60,0%), а также их количеством и клинической формой нарушения сперматогенеза, причем при наличии одновременно более 2 отягощающих факторов эффективность эмпирической терапии в восстановлении сперматогенеза не превышает 13,6%, и даже при использовании методов вспомогательных репродуктивных технологий, риск неудач достигает 93,6%. Риск неудачи при стойкой тератозооспермии составляет 70,2%, при азооспермии – 81,4%.
3. Использование трансплантации обогащенными клеточными культурами различного происхождения и разного варианта гистосовместимости (ксеногенные, аллогенные и аутологичные) способствует частичному восстановлению нарушенного сперматогенеза и восстановлению фертильности на животных моделях по сравнению с контролем, причем восстанавливает фертильность в ксеногенном варианте до 58% от исходных показателей, в аллогенном – до 25%, а в аутологичном – до 41,6%.
4. Наибольшая эффективность клеточной терапии достигается при использовании культур, полученных от плодов и новорожденных животных по сравнению со взрослыми донорами, при пересадке клеток в оба яичка по сравнению с односторонней трансплантацией и при введении клеток в количестве 500 000 клеток на каждый орган по сравнению с меньшими дозами (50 000 и 5000).
5. Концентрированная кондиционированная среда, содержащая секретом мезенхимных стволовых/прогениторных клеток жировой ткани, способна эффективно восстанавливать гормональный фон, а также полный цикл сперматогенеза, в количественном и качественном аспектах в аналогичные сроки, что позволяет расценивать данную технологию как самостоятельный эффективный способ преодоления мужского фактора инфертильности на животной модели, причем результаты сравнимы с биологическим воздействием изучаемых клеточных культур.
6. Использование концентрированной кондиционированной среды с секретом аутологичных мезенхимных стволовых/прогениторных клеток жировой ткани, прогностически более перспективно для дальнейшего изучения с целью клинического использования в преодолении мужского фактора бесплодия, чем обогащенные клеточные культуры, так как позволяет избежать множества этических, моральных, юридических и социальных вопросов, может эффективно стимулировать процессы регенерации поврежденного сперматогенного эпителия и восстанавливать сперматогенез у бесплодных животных с результативностью, сопоставимой с использованием самих клеточных культур, что позволяет считать этот метод перспективной альтернативной клеточной технологии у мужчин с повреждениями сперматогенеза и бесплодием.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При планировании лечения мужчин с бесплодием методом ВРТ, следует учитывать этиологические факторы, приведшие к инфертильности, выраженность нарушения сперматогенеза, а также количество отягощающих факторов. Наиболее неблагоприятными ситуациями являются: обусловленное бесплодие, стойкая к терапии тератозооспермия, криптозооспермия, азооспермия и наличие 2 и более отягощающих факторов, при которых вероятность успешного лечения не превышает 0,9-7,4%, что заставляет искать альтернативные методы лечения, в частности методами клеточных технологий.
2. Моделирование абдоминальной формы двухстороннего крипторхизма у животных позволяет имитировать выраженные нарушения сперматогенеза, наблюдаемые у бесплодных мужчин, и может служить полезной моделью для изучения новых методов восстановления репродуктивного здоровья мужчин, в том числе методом клеточной терапии.
3. Клеточная терапия с использованием обогащенных культур стволовых клеток различного происхождения обладает одинаковой эффективностью, но, в соответствии с современным законодательством, для клинического использования возможно применение только культуры аутологичных клеток.
4. Оптимальными условиями, повышающими эффективность клеточной терапии, являются возможность получения клеточного материала от наиболее молодых доноров и пересадка клеток в оба яичка при дозе вводимого клеточного материала 500 000 клеток на каждый орган.
5. Альтернативой методу пересадки стволовых клеток является использование обогащенной среды их культивирования, обладающей сопоставимой эффективностью с трансплантацией самих стволовых клеток в отношении восстановления сперматогенеза и фертильности, что позволит избежать ряда юридических проблем.
6. Для контроля биологических функций пересаженных стволовых клеток, а также оценки их влияния на сперматогенез целесообразно использовать иммуногистохимические маркеры, характеризующие жизнеспособность, принадлежность к стволовым клеткам и пролиферативную активность как пересаженных клеток, так и эндогенных сперматогониальных стволовых клеток.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Камалов, А.А. Трансплантация стволовых клеток при лечении мужского бесплодия / А.А. Камалов, Д.А. Охоботов, Е.А. Ефремов [и др.] // Мужское здоровье : 2 конгресс, 19-21 октября 2005 г. – Москва, 2005. – С. 56.
2. Зарайский, Е.И. Иммунологические факторы бесплодия и антигены сперматозоидов / Е.И. Зарайский, Г.В. Павлова, А.А. Камалов, Д.А. Охоботов // Медицинские науки. – 2007. – № 4. – С. 31-42.

3. Камалов, А.А. Лекарственная терапия мужского бесплодия / А.А. Камалов, Е.А. Ефремов, Д.А. Охоботов // Новая аптека. – 2007. – № 3. – С. 28-32.
4. Камалов, А.А. Стволовые клетки и их использование в современной клинической практике (Обзор литературы) / А.А. Камалов, Д.А. Охоботов // Врачебное сословие. – 2007. – № 4. – С. 39-44.
5. Камалов, А.А. Трансплантация сперматогенных стволовых клеток в эксперименте и клинической практике (аллогенная, ксеногенная, сингенная) / А.А. Камалов, Д.А. Охоботов, Е.И. Зарайский, Г.В. Павлова // Аспирант и соискатель. – 2007. – № 5. – С. 108-119.
6. **Охоботов, Д.А. Иммунологические факторы бесплодия и антигены сперматозоидов / Д.А. Охоботов, Е.И. Зарайский // Естественные и технические науки. – 2007. – № 4. – С. 148-153.**
7. Охоботов, Д.А. Стволовые клетки и их использование в клинической практике (обзор литературы) / Д.А. Охоботов, Е.И. Зарайский, Г.В. Павлова, А.А. Камалов // Медицинские науки. – 2007. – № 6. – С. 24-41.
8. Камалов, А.А. Использование модели двухстороннего абдоминального крипторхизма для изучения нарушений фертильности у животных / А.А. Камалов, Ю.В. Кудрявцев, В.И. Кирпатовский, Д.А. Охоботов [и др.] // Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии, 21 февраля 2008 г. – Москва, 2008. – С. 52-54.
9. Камалов, А.А. Исследование восстановления фертильности у животных после экспериментальной трансплантации обогащенных клеточных культур различных видов / А.А. Камалов, Д.А. Охоботов [и др.] // Мужское здоровье : IV конгресс, 12-14 ноября 2008 г. – Москва, 2008. – С. 16-17.
10. Камалов, А.А. Лечение индуцированного гипергонадотропного гипогонадизма у животных обогащенными клеточными культурами различных видов в эксперименте / А.А. Камалов, Ю.В. Кудрявцев, Д.А. Охоботов [и др.] // Первый пленум научного общества урологов Узбекистана. – Тошкент, 2008. – С. 214-216.
11. Камалов, А.А. Лечение infertility у животных трансплантацией обогащенных клеточных культур различных видов в эксперименте / А.А. Камалов, Д.А. Охоботов [и др.] // Первый пленум научного общества урологов Узбекистана. – Тошкент, 2008. – С. 228-229.
12. **Камалов, А.А. Особенности регенерации тестикулярной ткани и восстановление фертильности у крыс на фоне ксенотрансплантации обогащенных фетальных клеточных культур при двухстороннем абдоминальном крипторхизме / А.А. Камалов, Г.Т. Сухин, Д.А. Охоботов [и др.] // Урология. – 2008. – № 6. – С. 7-11.**
13. Камалов, А.А. Оценка изменения гормонального профиля у крыс при изучении эффектов ксеногенной трансплантации культурами, обогащенными стволовыми клетками, на модели двухстороннего трехнедельного абдоминального крипторхизма / А.А. Камалов, Ю.В. Кудрявцев, Д.А. Охоботов [и др.] // Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии, 21 февраля 2008 г. – Москва, 2008. – С. 148-150.
14. Камалов, А.А. Оценка индекса сперматогенеза после трансплантации обогащенных клеточных культур в эксперименте / А.А. Камалов, В.И. Кирпатовский, Д.А. Охоботов [и др.] // Мужское здоровье : IV конгресс, 12-14 ноября 2008 г. – Москва, 2008. – С. 17-18.

15. Камалов, А.А. Оценка фертильности у животных при изучении эффектов ксенотрансплантации культурами, обогащенными стволовыми клетками, на модели двухстороннего трехнедельного абдоминального крипторхизма / А.А. Камалов, Ю.В. Кудрявцев, Д.А. Охоботов [и др.] // Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии, 21 февраля 2008 г. – Москва, 2008. – С. 151-153.
16. Камалов, А.А. Перспективы развития высокотехнологической медицинской помощи пациентам андрологического профиля / А.А. Камалов, Д.А. Охоботов [и др.] // Мужское здоровье : IV конгресс, 12-14 ноября 2008 г. – Москва, 2008. – С. 6-7.
17. Камалов, А.А. Роль высоких технологий в повышении репродуктивного потенциала мужского населения / А.А. Камалов, Д.А. Охоботов [и др.] // Первый пленум научного общества урологов Узбекистана. – Ташкент, 2008. – С. 174.
18. **Сухих, Г.Т. Влияние ксенотрансплантации клеточных культур, обогащенных стволовыми и прогениторными клетками на гормональный профиль крыс с абдоминальным крипторхизмом / Г.Т. Сухих, А.А. Камалов, Д.А. Охоботов [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2008. – № 4. – С. 5-9.**
19. Камалов, А.А. Использование модели двухстороннего абдоминального крипторхизма для изучения фертильности у животных / А.А. Камалов, Д.А. Охоботов [и др.] // Материалы Пленума РОУ. – Нижний Новгород, 2009.
20. **Аполихин, О.И. Ксенотрансплантация обогащенных клеточных культур различных видов при экспериментальном лечении infertility / О.И. Аполихин, Д.А. Охоботов [и др.] // Андрология и генитальная хирургия. – 2009. – № 2. – С. 93.**
21. **Камалов, А.А. Оценка индекса сперматогенеза у крыс на фоне ксенотрансплантации обогащенных фетальных клеточных культур при двухстороннем абдоминальном крипторхизме / А.А. Камалов, Г.Т. Сухих, Е.А. Ефремов, Д.А. Охоботов [и др.] // Андрология и генитальная хирургия. – 2009. – № 2. – С. 99.**
22. Камалов, А.А. Применение обогащенных клеточных культур при лечении гипогонадизма в эксперименте / А.А. Камалов, Г.Т. Сухих, Д.А. Охоботов [и др.] // Фундаментальные исследования в уронефрологии, 14-16 мая 2009 года. – Саратов, 2009.
23. Камалов, А.А. Экспериментальное лечение infertility обогащенными клеточными культурами при двухстороннем абдоминальном крипторхизме / А.А. Камалов, Г.Т. Сухих, Д.А. Охоботов [и др.] // Фундаментальные исследования в уронефрологии, 14-16 мая 2009 года. – Саратов, 2009.
24. **Камалов, А.А. Восстановление половой функции и фертильности экспериментальных животных под действием различных культур в алло и ксеновариантах / А.А. Камалов, Г.Т. Сухих, Д.А. Охоботов [и др.] // Естественные и технические науки. – 2010. – № 4. – С. 95-99.**
25. Камалов, А.А. Использование жировой ткани мышей и крыс для выделения мезенхимальных стволовых клеток / А.А. Камалов, Н.А. Лопаткин, Д.А. Охоботов [и др.] // Мужское здоровье : VI конгресс с международным участием, 16-18 июня 2010 г. – Москва, 2010.
26. Камалов, А.А. Особенности иммунологической привилегированности яичка, как «забарьерного» органа / А.А. Камалов, Н.А. Лопаткин, Д.А. Охоботов [и др.]

- // Мужское здоровье : VI конгресс с международным участием, 16-18 июня 2010 г. – Москва, 2010.
27. Сухих, Г.Т. Получение культур стромальных клеток жировой ткани и яичка трансгенных мышей, несущих трансген GFP и их маркерный анализ / Г.Т. Сухих, Р.А. Полтавцева, Д.А. Охоботов [и др.] // Медицинские науки. – 2010. – Т. 36, № 1. – С. 74.
 28. Камалов, А.А. Исследование репарационных особенностей тестикулярной ткани у молодых животных на модели двухстороннего абдоминального крипторхизма / А.А. Камалов, В.А. Бычков, Д.А. Охоботов [и др.] // Мужское здоровье : VII конгресс с международным участием, 26-28 апреля 2011 г. – Ростов-на-Дону, 2011.
 29. Камалов, А.А. Особенности влияния обогащенной клеточной терапии на функцию яичка у крыс в сингенном варианте / А.А. Камалов, Г.Т. Сухих, Д.А. Охоботов [и др.] // Мужское здоровье : VII конгресс с международным участием, 26-28 апреля 2011 г. – Ростов-на-Дону, 2011.
 30. Камалов, А.А. Особенности восстановления сперматогенеза, при экспериментальной терапии бесплодия у крыс в зависимости от дозы и места введения / А.А. Камалов, Г.Т. Сухих, Д.А. Охоботов [и др.] // Мужское здоровье : VII конгресс с международным участием, 26-28 апреля 2011 г. – Ростов-на-Дону, 2011.
 31. Камалов, А.А. Система маркирования обогащенных культур, полученных из жировой ткани, при экспериментальной терапии бесплодия у крыс / А.А. Камалов, Г.Т. Сухих, Д.А. Охоботов [и др.] // Мужское здоровье : VII конгресс с международным участием, 26-28 апреля 2011 г. – Ростов-на-Дону, 2011.
 32. Камалов, А.А. Состояние мужского здоровья как фактор демографического кризиса / А.А. Камалов, Д.А. Охоботов // Наука и общество. – Санкт-Петербург, 2011.
 33. Глыбочко, П.В. Практическая урология / П.В. Глыбочко, Ю.Г. Аляев // Расстройства репродуктивной функции. Руководство для врачей / А.А. Камалов, М.Е. Чалый, Д.А. Охоботов. – Москва: ООО «Медфорум», 2012. – С. 296-343.
 34. Камалов, А.А. Стволовые клетки и их использование в современной клинической практике / А.А. Камалов, Д.А. Охоботов // Урология. – 2012. – № 5. – С. 105-114.
 35. Кирпатовский, И.Д. Сравнение репаративных особенностей тестикулярной ткани у молодых и половозрелых животных на модели двухстороннего абдоминального крипторхизма (экспериментальная работа) / И.Д. Кирпатовский, В.А. Бычков, Д.А. Охоботов [и др.] // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2012. – № 4. – С. 11-15.
 36. Аляев, Ю.Г. Интегративная урология. Руководство для врачей. Расстройства репродуктивной функции / Ю.Г. Аляев, А.А. Камалов, М.Е. Чалый, Д.А. Охоботов. – Москва: ООО «Медфорум», 2014. – С. 375-426.
 37. Охоботов, Д.А. Эффективность терапии нарушений сперматогенеза культурами, обогащенными стволовыми и прогениторными клетками, в зависимости от фактора билатеральности, в ксеногенной биологической системе in vitro /

- Д.А. Охоботов, Г.Т. Сухих, Е.И. Зарайский [и др.] // *Фундаментальная и практическая урология*. – Москва, 2014.
38. Камалов, А.А. Андрология. Фармакология без ошибок. Руководство для врачей. Вспомогательные репродуктивные технологии при мужском бесплодии / Э.В. Вартанян, А.А. Камалов, О.Н. Сэпп, С.Ю. Яровой, Д.А. Охоботов. – Подольск: «Е-ното», 2017. – С. 347-364. – ISBN 978-5-906023-15-5.
39. Камалов, А.А. Андрология. Фармакология без ошибок. Руководство для врачей. Препараты растительного происхождения / А.А. Камалов, В.В. Рафальский, Д.А. Охоботов, Д.М. Камалов. – Подольск: «Е-ното», 2017. – С. 76-79. – ISBN 978-5-906023-15-5.
40. Камалов, А.А. Андрология. Фармакология без ошибок. Руководство для врачей. Релиз – активные препараты / А.А. Камалов, В.В. Рафальский, Д.А. Охоботов. – Подольск: «Е-ното», 2017. – С. 81-86. – ISBN 978-5-906023-15-5.
41. Камалов, А.А. Изменения уровня иммуноглобулинов (антиспермальных антител классов А и G) у пациентов с инфертильностью на фоне терапии просперматогенным биостимулятором / А.А. Камалов, Д.А. Охоботов // *Медицинский совет. Научно-практический журнал для врачей*. – 2017. – № 13. – С. 144-149.
42. Камалов, А.А. Использование нового биоматериала на основе продуктов секреции мезенхимных стволовых клеток человека и коллагена для восстановления сперматогенеза на модели экспериментального крипторхизма / А.А. Камалов, А.Ю. Ефименко, Д.А. Охоботов [и др.] // *Технологии живых систем*. – 2017. – Т. 14, № 1. – С. 4-17.
43. Камалов, А.А. Стимуляция восстановления сперматогенеза при использовании МСК жировой ткани человека и продуктов их секреции на модели двухстороннего абдоминального крипторхизма / А.А. Камалов, В.И. Кирпатовский, Д.А. Охоботов [и др.] // *Гены и Клетки : материалы III Национального Конгресса по Регенеративной Медицине*, 15-18 ноября 2017 г. – Москва, 2017. – Т. 12, Серия 3. – С. 186.
44. Охоботов, Д.А. Формирование соединительнотканной гранулемы при введении мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека в иммунопривилегированную зону яичка / Д.А. Охоботов, А.А. Камалов, В.И. Кирпатовский, [и др.] // *Гены и Клетки : материалы III Национального Конгресса по Регенеративной Медицине*, 15-18 ноября 2017 г. – Москва, 2017. – Т. 12, Серия 3. – С. 185.
45. Сагарадзе, Г.Д. Разработка комбинированного препарата на основе секретируемых продуктов мезенхимальных стволовых/стромальных клеток человека для восстановления сперматогенеза / Г.Д. Сагарадзе, А.Ю. Ефименко, Охоботов Д.А. [и др.] // *Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии*. – Рязань, 2017. – С. 87-89.
46. Сагарадзе, Г.Д. Секретом мезенхимных стволовых/стромальных клеток (МСК) человека как основа для создания новых препаратов и биоматериалов для регенеративной медицины / Г.Д. Сагарадзе, А.Ю. Ефименко, Д.А. Охоботов [и др.] // *Гены и Клетки : материалы III Национального Конгресса по Регенеративной Медицине*, 15-18 ноября 2017 г. – Москва, 2017. – Том 12, Серия 3. – С. 211-211.

47. Камалов, А.А. Анализ неудач консервативного лечения клинических форм мужской инфертильности / А.А. Камалов, В.К. Карпов, Д.А. Охоботов [и др.] // Уральский медицинский журнал. – 2018. – Т. 164, № 9. – С. 133-136.
48. Камалов, А.А. Анализ неудач современных методов лечения мужского бесплодия / А.А. Камалов, Д.А. Охоботов, М.В. Лалабекова [и др.] // Мужское здоровье : XIV конгресса с международным участием, 27-29 апреля 2018 г. – Сочи, 2018. – С. 104-105.
49. Камалов, А.А. Влияние взаимной отягощенности вредных факторов на качество сперматогенеза и показатель фертильности у мужчин / А.А. Камалов, Д.А. Охоботов [и др.] // Мужское здоровье : XIV конгресса с международным участием, 27-29 апреля 2018 г. – Сочи, 2018. – С. 102-103.
50. Камалов, А.А. Роль мужского фактора в формировании бесплодия супружеской пары / А.А. Камалов, Д.А. Охоботов, М.В. Лалабекова // Мужское здоровье : XIV конгресса с международным участием, 27-29 апреля 2018 г. – Сочи, 2018. – С. 105-106.
51. Камалов, А.А. Эффективность современных методов лечения тератозооспермии / А.А. Камалов, Д.А. Охоботов, М.В. Лалабекова [и др.] // Мужское здоровье : XIV конгресса с международным участием, 27-29 апреля 2018 г. – Сочи, 2018. – С. 103-104.
52. Сагарадзе, Г.Д. Роль паракринных факторов мезенхимных стромальных клеток в регуляции сперматогенной ниши / Г.Д. Сагарадзе, Н.А. Басалова, Д.А. Охоботов / Гены и клетки : материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы регенеративной медицины, инновации в репродуктологии». – Москва, 2018. – Т. 1, Прил. № 1. – С. 96-96.
53. Камалов, А.А. Выбор химического соединения, обладающего комбинированным сперматотоксическим эффектом, для создания модели управляемого токсического повреждения сперматогенеза / А.А. Камалов, А.Ю. Ефименко, Д.А. Охоботов [и др.] // Технологии живых систем. – 2019. – Т. 16, № 3. – С. 5-20.
54. Камалов, А.А. Диагностика мужского бесплодия : учебно-методическое пособие по самостоятельной аудиторной работе / А.А. Камалов, Э.В. Вартанян, О.Н. Сэпп, Е.А. Девятова, К.А. Цатурова, А.В. Маркин, Т.Р. Курносова, М.Е. Чалый, Д.А. Охоботов. – Москва, 2019. – 24 с. – ISBN 978-5-6042754-0-5.
55. Камалов, А.А. Функциональная активность лейкоцитов в семенной жидкости при патозоспермии / А.А. Камалов, Е.В. Проскурина, Д.А. Охоботов [и др.] // Урология. – 2019. – № 6. – С. 78-82.
56. Божедомов, В.А. Структура нарушений качества спермы у мужчин из бесплодных пар и алгоритм ведения таких пациентов в специализированных учреждениях третьего уровня / В.А. Божедомов, А.А. Камалов, Д.А. Охоботов [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2020. – № 11. – С. 159-167.
57. Монакова, А.О. Перспектива применения продуктов на основе мезенхимных стромальных клеток или их секрета для лечения мужского бесплодия / А.О. Монакова, А.Ю. Ефименко, Д.А. Охоботов [и др.] // Биотехнология: состояние и перспективы развития : материалы международного форума. – Москва, 2020. – С. 235-237.
58. Божедомов, В.А. Варикоцеле и репродуктивная функция: возможности коррекции патозоспермии (данные проспективного сравнительного

- исследования) / В.А. Божедомов, А.А. Камалов, Д.А. Охоботов [и др.] // Урология. – 2021. – № 2. – С. 62-68.
59. Божедомов, В.А. Варикоцеле и репродуктивная функция: эпидемиология и риск развития бесплодия (данные обследования 3908 мужчин) / В.А. Божедомов, А.А. Камалов, Д.А. Охоботов [и др.] // Урология. – 2021. – № 3. – С. 122-128.
60. Охоботов, Д.А. Возможности применения секрета мезенхимальных стромальных клеток в лечении мужского бесплодия / Д.А. Охоботов, Г.Д. Сагарадзе, Н.А.Басалова [и др.] // Междисциплинарная Endourocenter meeting-2021 : научно-практическая конференция с международным участием. — Санкт-Петербург, 2021. – Т. 1, Серия 1. – С. 14-15.
61. Охоботов, Д.А. Моделирование нарушений сперматогенеза химиотерапевтическими средствами – цисплатином и доксорубицином / Д.А. Охоботов, А.Ю. Ефименко, А.А. Камалов [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2021. – Т. 14, № 4. – С. 95-101.
62. Охоботов, Д.А. Моделирование нарушений сперматогенеза химиотерапевтическими средствами – цисплатином и доксорубицином / Д.А. Охоботов, Г.Д. Сагарадзе, Н.А.Басалова [и др.] // Мужское здоровье : Мужское здоровье : сборник трудов XVII Конгресса с международным участием. – Сочи, 2021. – С. 126-127.
63. Охоботов, Д.А. Перспективы использования секрета мезенхимальных стромальных клеток для лечения мужского бесплодия: миф или реальность / Д.А. Охоботов, Г.Д. Сагарадзе, Н.А. Басалова [и др.] // Сборник Тезисов XXI Конгресса Российского общества урологов. – 2021. – Т. 5, Серия 1. – С. 388-388.
64. Проскурнина, Е.В. Внутриклеточный гомеостаз активных форм кислорода сперматозоидов: опыт применения хемилюминисценции / Е.В. Проскурнина, А.А. Камалов, Д.А. Охоботов [и др.] // Технологии живых систем. – 2022. – Т. 19, № 1. – С. 28-44.
65. Патент № 2408378 Российская Федерация, А61Л 31/7048 (2006.01) А61К 38/21 (2006.01) А61К 9/02 (2006.01) А61К 9/06 (2006.01) А61К 15/08 (2006.01) А61К 19/00 (2006.01). Способ лечения хронического простатита : № 2008105493/15 : заявл. 15.02.2008 : опубл. 10.01.11 / Камалов А.А., Ефремов Е.А., Дорофеев С.Д., Охоботов Д.А., Мельник Я.И. [и др.]. – Бюл. № 1.
66. Патент № 2652902 Российская Федерация, А61М 5/00 (2006.01) А61К 35/28 (2015.01) А61К 38/39 (2006.01). Способ стимуляции сперматогенеза : № 2016151259 : заявл. 26.12.2016 : опубл. 03.05.2018 / Ткачук В.А., Акопян Ж.А., Ефименко А.Ю., Камалов А.А., Кирпатовский В.И., Макаревич О.А., Макаревич П.И., Нибирицкий П.П., Охоботов Д.А., Сагарадзе Г.Д. – Бюл. № 13.
67. Патент № 2653779 Российская Федерация, А61М 5/00 (2006.01) А61К 35/28 (2015.01) А61Р 15/08 (2006.01). Способ стимуляции сперматогенеза : № 2016151258 : заявл. 26.12.2016 : опубл. 14.05.2018 / Ткачук В.А., Акопян Ж.А., Ефименко А.Ю., Камалов А.А., Кирпатовский В.И., Макаревич О.А., Макаревич П.И., Нибирицкий П.П., Охоботов Д.А., Сагарадзе Г.Д., Тарасова Е.В. – Бюл. № 14.
68. Sukhikh, G. Effect of Xenotransplantation of Cell Cultures Enriched with Stem and Progenitor Cells on Hormonal Profile of Rats with Abdominal Cryptorchism / A. Kamalov, R. Poltavtseva, E. Zaraiskii, E. Plotnikov, V. Kirpatovskii,

- E. Efremov, E. Orlova, G. Pavlova, D. Okhobotov // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2008. – Vol. 146, № 4. – p. 517-521.
69. Kamalov, A. Estimation of Leidig cell population under experimental therapy by fortified cell culture in abdominal cryptorchidism / A. Kamalov, D. Ohobotov, Y. Kudryavtsev, V. Kirpatovsky, E. Efremov, G. Sukhih, R. Poltavtseva, E. Plotnikov, E. Zarausky // *American Journal of Men's Health*. – 2009. – Vol. 6, № 3. – P. 273-273.
70. Kamalov A. The application of a novel biomaterial based on the secreted products of human mesenchymal stem cells and collagen for spermatogenesis restoration in the model of experimental cryptorchidism / A. Kamalov, V. Kirpatovsky, D. Ohobotov, A. Efimenko, P. Makarevich, G. Sagaradze, O. Makarevich, P. Nimiritsky, N. Basalova, D. Kamalov, E. Osidak, S. Domogatsky, Zh. Akopyan, V. Tkachuk // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 2083-2094.
71. Basalova, N. Possible mechanisms of therapeutic effects of mesenchymal stromal cells conditioned medium on the model of cryptorchidism in rats / N. Basalova, G. Sagaradze, E. Kuznetsova, V. Kirpatovsky, D. Ohobotov, A. Kamalov, A. Efimenko // *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology (BGRS\SB-2018) : The Eleventh International Conference (20-25 Aug. 2018, Novosibirsk, Russia)*. – Novosibirsk, 2018. – P. 21-21.
72. Sagaradze, G. Role of paracrine factors secreted by mesenchymal stromal cells in spermatogonial stem cell niche regulation / G. Sagaradze, N. Basalova, V. Kirpatovsky, D. Ohobotov, O. Grigorieva, A. Kamalov, A. Efimenko // *Human Gene Therapy*, s. A2-A169 (November 2018). – United States, 2018. – Vol. 27. – P. 136.
73. Sagaradze, G. A magic kick for regeneration: role of mesenchymal stromal cell secretome in spermatogonial stem cell niche recovery / G. Sagaradze, N. Basalova, V. Kirpatovsky, D. Ohobotov, P. Nimiritsky, O. Grigorieva, V. Popov, A. Kamalov, V. Tkachuk, A. Efimenko // *Stem cell research & therapy*. – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. e342.
74. Sagaradze, G. Application of rat cryptorchidism model for the evaluation of mesenchymal stromal cell secretome regenerative potential / G. Sagaradze, N. Basalova, V. Kirpatovsky, D. Ohobotov, O. Grigorieva, V. Balabanyan, A. Kamalov, A. Efimenko // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2019. – Vol. 109. – P. 1428-1436.
75. Sagaradze, G. Mesenchymal stromal cell secretome as a promising tool for male infertility treatment / G. Sagaradze, N. Basalova, V. Kirpatovsky, D. Ohobotov, O. Grigorieva, P. Nimiritsky, E. Novoseletskaya, Z. Akopyan, A. Kamalov, A. Efimenko // *Human Gene Therapy*. – 2019. – P. A218.
76. Monakova, A.O. Cellular mechanisms of mesenchymal stromal cells (MSC) secretome regenerative effects for treating male infertility / A. Monakova, G. Sagaradze, N. Basalova, V. Kirpatovsky, D. Ohobotov, V. Popov, O. Grigorieva, A. Kamalov, A. Efimenko // *ISCOMS 2021 Book of Abstracts*. – 2021. – P. 211-211.