

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора
по научной работе
обособленного подразделения
Медицинский научно-образовательный
центр Федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова»,
Д.м.н., профессор РАН, член-корр. РАН
Мацкеплишвили С.Т.



20 22 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова»
(ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова).

Диссертация Охоботова Дмитрия Александровича «Оценка эффективности современных методов лечения мужского бесплодия и возможности использования обогащенных клеточных культур» выполнена на базе Медицинского научно-образовательного центра «Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова», в отделе урологии и андрологии.

В период подготовки диссертации Охоботов Дмитрий Александрович работал в медицинском научно-образовательном центре МГУ имени М.В. Ломоносова, в должности врача уролога и в отделе урологии и андрологии в должности старшего научного сотрудника, а также доцента кафедры урологии и андрологии факультета фундаментальной медицины

МГУ имени М.В.Ломоносова.

В 2001 году окончил Московскую Медицинскую Академию имени И.М.Сеченова по специальности «Лечебное дело».

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук защищена в диссертационном совете Д.208.056.01 на базе ФГБУ НИИ урологии Росмедтехнологий в 2008 году (решение Диссертационного совета от 16 декабря 2008 года № 144, диплом кандидата наук от 16 января 2009 года ДКН № 073890).

Научный консультант - Камалов Армаис Альбертович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой урологии и андрологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова (Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»), директор центра и заведующий отделом урологии и андрологии Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова (Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»).

По итогам обсуждения диссертации принято следующее **заключение**:

Актуальность проблемы.

В настоящее время бесплодной является каждая 6 пара, а каждая 5 испытывает трудности с зачатием. В общей структуре бесплодия на долю мужского фактора приходится не менее 50%. Работа посвящена изучению современных возможностей лечения мужского бесплодия, а также разработке нового перспективного направления – экспериментальной интратестикулярной терапии infertility с помощью культур,

обогащенных стволовыми и прогениторными клетками различного происхождения в ксеногенном, аллогенном и аутологичном вариантах.

Научная новизна

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 при воспалительных заболеваниях 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»).

Практическая значимость

Анализ неудач лечения мужского бесплодия позволяет своевременно выделять ключевые факторы, вызывающие нарушения сперматогенеза у мужчин и своевременно компенсировать негативные последствия на фоне устранения этих этиологических факторов.

В рамках проведения доклинических испытаний предложено экспериментальное решение лечения нарушений сперматогенеза на животных моделях с помощью обогащенных клеточных культур, которые позволили провести этап доклинических испытаний для препарата, созданного на основе секрета мезенхимальных стволовых и прогениторных клеток жировой ткани.

Предложенный алгоритм диагностики и лечения мужчин с бесплодием, является перспективным направлением «системы поддержки принятия решений» репродуктологом или урологом и может быть транслирован в реальную клиническую практику.

Разработанная на основе работ соискателя, технология получения секрета мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани и разработка лекарственного препарата на ее основе, способна существенно повысить возможности современных методов лечения мужского бесплодия, расширить

границы его применения и позволяет рекомендовать, как основу для проведения клинических испытаний, необходимых для внедрения его в клиническую практику репродуктолога и уролога-андролога.

Обоснованность и достоверность научных положений и рекомендаций

Достоверность результатов проведенного исследования подтверждена выполнением работы на достаточном материале (554 пациентов), представительностью и достоверностью исходных данных: методологическая база исследования включала применение в рамках системного подхода клинического, инструментального, биохимического, морфологического, иммуногистохимического и статистического методов.

Для контроля за герминогенной функцией семенников использовался мониторинг общего тестостерона и лютеинизирующего гормона (ЛГ). Для контроля за функциональной активностью сперматогенного эпителия использовалось изучение уровней фолликулостимулирующего гормона (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).

Метод гистологических исследований основывался на микроскопической оценке состояния препаратов семенников, приготовленных по стандартной методике парафиновых срезов. Фрагменты макропрепаратов или целые объекты помещались в стеклянные флаконы, объемом до 20мл³, содержащие 10% раствор формальдегида, для последующей подготовки препаратов, по методу парафиновых блоков. Полученные микропрепараты окрашивались гематоксилином – эозином. Для электронной микроскопии препараты

фиксируются в 10% растворе глутарового альдегида и далее вельсь по стандартной проводке.

Диагностика гипосперматогенеза и атрофии сперматогенных клеток яичка проводилась по методу Астраханцева А.Ф. и Соловьева А.А., путем подсчета сустентоцитов на 30 строго поперечных срезах семенных канальцев гистологического препарата, с помощью микроскопа «Биолан» - Р11 (ЛОМО), при общем увеличении оптической системы X 420,0. Затем производились подсчет общего количества сперматогенных клеток и расчет индекса сперматогенеза, как соотношение сустентоциты/клетки сперматогенной ткани. Также измерялся минимальный диаметр поперечного среза семенного канальца оптическим винтовым окуляром-микрометром используемого микроскопа, и производилась оценка состояния клеток Лейдига, путем их подсчета в 30 межканальцевых локусах, и их морфометрической оценкой.

Статистическая обработка полученных результатов выполнялась на персональном компьютере с использованием программного обеспечения STATISTICA12. Перед проведением анализа и выбором статистических критериев, выборки проверены на соответствие закону нормального распределения 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 перцентиля (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). При выборе статистических процедур учитывались методологические требования международного конгресса по гармонизации GGP «Статистические принципы для клинических исследований» (1998).

Оценка и математический анализ полученных соискателем результатов проведенных исследований, позволяют сделать вывод о достоверности и обоснованности полученных эпидемиологических данных и предложенных способов диагностики и лечения мужского бесплодия, а разработанный в результате исследований стимулирующий препарат, после проведения клинических испытаний, может быть рекомендован для внедрения в практику.

Тема диссертации утверждена на заседании Ученого совета МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова 12 октября 2020 г., протокол № 5.

Проведение диссертационного исследования одобрено Этическим комитетом научных исследований МНОЦ МГУ от 21 декабря 2020 года, протокол № 12/20.

Апробация работы. Основные положения диссертации обсуждены на совместном заседании отдела 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.

Основные результаты и положения диссертации доложены и обсуждены на: пленуме Российского общества урологов 6-8 ноября 2013 года, Москва, IV научно-практической конференции "Фундаментальная и практическая урология" 4-5 марта 2015 года, г. Москва; XVI Всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов 14-17 июня 2016 года; IV съезде деских урологов - андрологов 4-5 апреля 2015 года, Парк отель Кранкино, Зеленоград; на конференции StemCellBio 2016, Санкт-Петербург, 9-11 ноября 2016 года;

на конгрессе Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society - Asia Pacific Meeting (TERMIS-AP 2016), Tamsui Township, Тайвань (Китай), 3-6 сентября 2016 года; Сеченовском Международном Биомедицинском Саммите 2017 (СМБС-2017), Москва, 16-20 июня 2017 года; XIII Съезде и XVII конгрессе Российского общества урологов 8-10 ноября 2017 года; III национальном конгрессе по регенеративной медицине, 15-18 ноября 2017 года, Москва; VI, VII, XI, XII, XIII и XIV Конгрессах "Мужское здоровье" с международным участием (16-18 июня 2010 года, Москва, 26-28 апреля 2011 года, Ростов-на-Дону, Сочи 27-30 апреля 2015 года, Казань 16-18 июня 2016 года, Кисловодск 26-28 апреля 2017 года, Сочи. 27 – 29 апреля 2018 г.); XVI Конгрессе «Мужское здоровье» с международным участием. Россия, Москва. 26–28 июня 2020 г.; XX Конгрессе Российского общества урологов. Online, 26–29 ноября 2020г.

Личное участие соискателя в разработке проблемы.

Личный вклад автора в получении результатов, изложенных в диссертации, является основным на всех этапах работы – анализ научной отечественной и зарубежной литературы, обоснование актуальности темы диссертационной работы и степени разработанности проблемы, разработка идеи работы, формулировка цели и задач работы, определение методологического подхода и методов их решения; непосредственное участие соискателя в получении исходных данных. Лично проведены хирургические вмешательства на животных (крысы, мыши, кролики) на 2, 3 и 4 этапах работы. Осуществлен сбор биоматериалов для проведения гормонального, гистологического и иммуногистохимического контролей. Самостоятельно выполнена основная часть работы – клиническое обследование, диагностика и лечение 554 пациентов, сформированы клиническая и экспериментальные базы данных, проведены анализ и статистическая обработка полученных данных, обобщение результатов, формулировка положений, выносимых на

защиту, выводов и практических рекомендаций, подготовка публикаций, апробация результатов диссертационного исследования.

Полнота опубликования в печати

По материалам диссертации опубликованы 75 печатных работ, из них 19 в научных рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России и 7 в Перечне научных изданий, индексируемых в международных реферативных базах данных и системах цитирования (Web of Science, Scopus, Pub Med), главы в четырех монографиях и методических руководствах.

Наиболее полно основные положения и выводы диссертационной работы отражены в следующих изданиях:

1. Кирпатовский В.И., Нарушения функции яичек при индуцированном двухстороннем крипторхизме в эксперименте / Кирпатовский В.И., Кудрявцев Ю.В., Ефремов Е.А., **Охоботов Д.А.**, Никонова Л.М. // Естественные и технические науки, - 2007. - № 4, с 148-153.
2. Sukhikh G. Effect of Xenotransplantation of Cell Cultures Enriched with Stem and Progenitor Cells on Hormonal Profile of Rats with Abdominal Cryptorchism / Kamalov A., Poltavtseva R., Zaraiskii E., Plotnikov E., Kirpatovskii V. , Efremov E., Orlova E., Pavlova G., **Okhobotov D.** // Bulletin of Experimental Biology and Medicine, - 2008.- vol. 146, - № 4, p. 517-521.
3. Сухих Г.Т. Влияние ксенотрансплантации клеточных культур, обогащенных стволовыми и прогениторными клетками на гормональный профиль крыс с абдоминальным крипторхизмом / Сухих Г.Т., Камалов А.А., Полтавцева Р.А., Зарайский Е.И., Плотников Е.Ю., Кирпатовский В.И., Ефремов Е.А., **Охоботов Д.А.**, Орлова Е.В., Павлова Г.В.// Клеточные технологии в биологии и медицине, - 2008.- № 4, с. 5-9.

4. Камалов А.А., Особенности регенерации тестикулярной ткани и восстановление фертильности у крыс на фоне ксенотрансплантации обогащенных фетальных клеточных культур при двухстороннем абдоминальном крипторхизме / Камалов А.А., Сухих Г.Т., Кирпатовский В.И., Зарайский Е.И., Полтавцева Р.А., Плотников Е.Ю., Кудрявцев Ю.В., Ефремов Е.А., **Охоботов Д.А.**// Урология, - 2008. - №6, с.7-11.
5. 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. Zaraisky // American Journal of Men's Health. – 2009. – vol. 6. - № 3, p. 273-273.
6. Камалов А.А. Восстановление половой функции и фертильности экспериментальных животных под действием различных культур в алло и ксеновариантах / Камалов А.А., Сухих Г.Т., Зарайский Е.И., Кирпатовский В.И., Полтавцева Р.А., **Охоботов Д.А.**, Каменская К.А., Макаров Е.А. // Естественные и технические науки. – 2010. - № 4, с. 95-99.
7. Камалов А.А. Стволовые клетки и их использование в современной клинической практике / Камалов А.А., **Охоботов Д.А.** // Урология. - 2012. - № 5, с. 105-114.
8. 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.

9. Камалов А.А. Изменения уровня иммуноглобулинов (антиспермальных антител классов А и G) у пациентов с инфертильностью на фоне терапии просперматогенным биостимулятором / А.А. Камалов, **Охоботов Д.А.** // Медицинский совет. Научно-практический журнал для врачей. – 2017. - № 13, с. 144-149.
10. Камалов А.А. Использование нового биоматериала на основе продуктов секреции мезенхимных стволовых клеток человека и коллагена для восстановления сперматогенеза на модели экспериментального крипторхизма / Камалов А.А., Кирпатовский В.И., Ефименко А.Ю., Макаревич П.И., Сагарадзе Г.Д., Макаревич О.А., Нимирицкий П.П., Басалова Н.А., Камалов Д.М., Осидак Е.О., Домогатский С.П., **Охоботов Д.А.**, Акопян Ж.А., Ткачук В.А. // Технологии живых систем. – 2017. - том 14. - № 1, с. 4-17
11. Камалов А.А. Анализ неудач консервативного лечения клинических форм мужской инфертильности / Камалов А.А., **Охоботов Д.А.**, Дзитиев В.К., Карпов В.К., Низов А.Н.// Уральский медицинский журнал. – 2018. - том 164, - № 9, с. 133-136
12. 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.Grigrorieva, A.Kamalov, A. Efimenko A. // Human Gene Therapy, s. A2–A169 (November 2018), - 2018. - United States - vol. 27, p. 136.
13. 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. Grigrorieva, V. Popov, A. Kamalov, V. Tkachuk, A. Efimenko // Stem cell research & therapy. – 2019. – Vol. 10, - № 1 – p. e342.
14. 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.
- 15.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.
- 16.Камалов А.А. Выбор химического соединения, обладающего комбинированным сперматотоксическим эффектом, для создания модели управляемого токсического повреждения сперматогенеза / Камалов А.А., Ефименко А.Ю., Сагарадзе Г.Д., Чалый М.Е., **Охоботов Д.А.**, Низов А.Н., Дзитиев В.К., Афанасьевская Е.В., Стригунов А.А., Нестерова О.Ю. // Технологии живых систем. – 2019. - том 16. - № 3, с.5-20.
- 17.Камалов А.А. Функциональная активность лейкоцитов в семенной жидкости при патоспермии / Камалов А.А., Проскурнина Е.В., **Охоботов Д.А.**, Черных В.Б., Чистякова С.Ю.// Урология. – 2019. - № 6, с. 78-82
- 18.Божедомов В.А. Структура нарушений качества спермы у мужчин из бесплодных пар и алгоритм ведения таких пациентов в специализированных учреждениях третьего уровня / Божедомов В.А., Николаева М.А., Ушакова И.В., Божедомова Г.Е., Липатова Н.А., Камарина Р.Н., **Охоботов Д.А.**, Камалов А.А. // Акушерство и гинекология. – 2020. - № 11, с.159-167.

Внедрение результатов исследования в практику.

Практические результаты исследований внедрены в клинике Медицинского научно-образовательного центра МГУ им. М.В. Ломоносова и

в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница №31». После проведения 2 и 3 фаз клинических испытания препарат, созданный на основе работ по изучению клинических эффектов секрета мезенхимальных стволовых и прогениторных клеток жировой ткани, может быть внедрен в клинические протоколы ведения пациентов с тяжелыми формами мужского фактора бесплодия.

Первичная документация проверена и соответствует материалам, включенным в диссертацию.

Диссертационная работа Охоботова Дмитрия Александровича «Оценка эффективности современных методов лечения мужского бесплодия и возможности использования обогащенных клеточных культур», является завершенным научно-квалификационным исследованием, в котором решена крупная научная проблема лечения мужчин с нарушениями фертильности.

Научная специальность, которой соответствует диссертация.

Диссертация «Оценка эффективности современных методов лечения мужского бесплодия и возможности использования обогащенных клеточных культур» соответствует паспорту специальности 14.01.23 – Урология и областям исследования: пункту 1 - Изучению этиологии, патогенеза и распространенности урологических заболеваний, в частности мужского бесплодия, а также пункту 3 - Экспериментальная и клиническая разработка методов лечения урологических заболеваний и внедрение их в клиническую практику.

Диссертация Охоботова Дмитрия Александровича на тему «Оценка эффективности современных методов лечения мужского бесплодия и возможности использования обогащенных клеточных культур», рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.23 - Урология.

Заключение принято на совместном заседании сотрудников отдела урологии и андрологии 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).

Присутствовало на заседании 12 человек, из них докторов наук 5 человек, в том числе докторов наук по специальности представленной диссертации - 5 человек.

Результаты голосования: «за» – 12 чел., «против» – нет, «воздержалось» – нет (протокол № 2 от 21 февраля 2021 года).



Сорокин Николай Иванович
МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова
доктор медицинских наук.
Отдел урологии и андрологии.
Ведущий научный сотрудник.

Согласен на обработку моих персональных данных

Подпись доктора медицинских наук Сорокина Николая Ивановича заверяю.

Ученый секретарь МНОЦ МГУ



Орлова Яна Артуровна