

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА

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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научный консультант:

Камалов Армаис Альбертович

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

Москва – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
Глава 1 СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ .....	16
1.1 Эпидемиология и этиология мужского бесплодия.....	16
1.2 Диагностика мужского бесплодия .....	20
1.2.1 Первичный прием .....	21
1.2.2 Дополнительные методы диагностики .....	21
1.3 Лечение мужского бесплодия.....	28
1.3.1 Немедикаментозное лечение .....	28
1.3.2 Планирование .....	28
1.3.3 Диетотерапия.....	30
1.3.4 Физиотерапия .....	30
1.3.5 Стандартная консервативная терапия .....	31
1.3.6 Консервативная терапия бесплодия, обусловленного органическими факторами .....	34
1.3.7 Лечение бесплодия, обусловленного наличием инфекций или другими воспалительными заболеваниями .....	35
1.3.8 Иммунопивилегированные факторы репродуктивного тракта .....	37
1.3.9 Лечение инфертильности, на фоне экстрагенитальных заболеваний и методов их лечения .....	40
1.3.10 Нарушения кристаллообразующей функции спермоплазмы и их лечение .....	41
1.3.11 Неспецифические модуляторы .....	42
1.3.12 Комбинированные витаминно-минеральные комплексы .....	42
1.3.13 Реконструктивные репродуктивные операции .....	43
1.4 Вспомогательные репродуктивные технологии – мужской фактор.....	44
1.4.1 Внутриматочная инсеминация.....	44
1.4.2 Экстракорпоральное оплодотворение.....	45
1.5 Перспективные направления для лечения инфертильности у мужчин.....	46
1.5.1 Механизмы иммунопивилегированности мужских и женских половых клеток и органов репродуктивного тракта .....	46
1.5.2 Генетически обусловленная инфертильность и методы ее коррекции .....	46
1.5.3 Механизмы апоптоза сперматозоидов .....	47
1.5.4 Трансплантация донорских клеток Сертоли .....	47

1.5.5 Экспериментальная регуляция пола у животных .....	47
1.5.6 Возможности терапии infertility культурами, обогащенными стволовыми / прогениторными клетками, на основе изучения современных аспектов клеточного развития и их функций .....	48
Глава 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	51
Глава 3 АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ СПЕРМАТОГЕНЕЗА ПРИ УЧАСТИИ ПАЦИЕНТОВ В ПРОГРАММЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ.....	79
3.1 Клиническая характеристика мужчин с infertility .....	79
3.2 Результаты лечения infertility у мужчин с инфекциями передающимися половым путем .....	81
3.3 Результаты лечения infertility у мужчин с хроническим простатитом.....	84
3.4 Результаты лечения infertility у мужчин с варикоцеле .....	86
3.5 Результаты лечения infertility у мужчин с крипторхизмом .....	88
3.6 Результаты лечения infertility у мужчин с аномалиями строения половых органов и опухолями органов мочеполовой системы .....	90
3.7 Результаты лечения infertility у мужчин с иммунологическим фактором.....	91
3.8 Результаты лечения infertility у мужчин с генетическим фактором.....	93
3.9 Результаты лечения infertility у мужчин с эндокринными факторами.....	94
3.10 Результаты лечения infertility у мужчин с идиопатическим фактором.....	96
3.11 Результаты лечения infertility у мужчин с тератозооспермией.....	97
3.12 Результаты лечения infertility у мужчин с азооспермией .....	99
3.13 Итоговый анализ результатов лечения infertility.....	101
3.14 Заключение.....	104
Глава 4 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ КУЛЬТУРАМИ, ОБОГАЩЕННЫМИ СТВОЛОВЫМИ / ПРОГЕНИТОРНЫМИ КЛЕТКАМИ КСЕНОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ .....	108
4.1 Популяционные характеристики экспериментальных животных .....	108
4.2 Характеристические особенности клеточных культур, обогащенных ксеногенными стволовыми и прогениторными клетками.....	108
4.3 Результаты исследований гормонов крови в экспериментальных группах.....	109
4.4 Морфологические исследования тканей яичек в группах ксеноварианта.....	111
4.5 Изменения популяции клеток Лейдига .....	114
4.6. Исследование индекса сперматогенеза по Астраханцеву–Соловьеву .....	115
4.7 Исследование фертильности экспериментальных животных .....	117

4.8 Иммуногистохимический маркерный анализ групп ксеноварианта .....	119
4.8.1 Иммуногистохимическая характеристика тканей реципиента после ксеногенной терапии культурами, обогащенными стволовыми / прогениторными клетками.....	119
4.8.2 Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс на ранних сроках (до 28 дня наблюдения).....	119
4.8.3 Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс на поздних сроках (90-120 дни наблюдения) .....	120
4.9 Заключение.....	122
 Глава 5 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ КУЛЬТУРАМИ АЛЛОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.....	
5.1 Популяционные характеристики экспериментальных животных .....	124
5.2 Характериологические особенности клеточных аллогенных культур.....	124
5.3 Результаты исследований гормонов крови в экспериментальных группах.....	125
5.4 Морфологические исследования тканей яичек в группах аллогенного варианта.....	127
5.5. Исследование индекса сперматогенеза по Астраханцеву–Соловьеву .....	128
5.6 Исследование фертильности экспериментальных животных .....	130
5.7 Иммуногистохимический маркерный анализ групп аллогенного варианта.....	131
5.7.1 Иммуногистохимическая характеристика тканей реципиента после аллогенной клеточной терапии .....	131
5.7.2 Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс на ранних сроках (до 28 дня наблюдения).....	131
5.7.3 Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс на поздних сроках (90-120 дни наблюдения) .....	133
5.8 Заключение.....	134
 Глава 6 ТЕРАПИЯ КУЛЬТУРАМИ, ОБОГАЩЕННЫМИ СТВОЛОВЫМИ / ПРОГЕНИТОРНЫМИ КЛЕТКАМИ АУТОЛОГИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.....	
6.1 Популяционные характеристики экспериментальных животных .....	136
6.2 Характериологические особенности клеточной культуры, обогащенной аутологичными стволовыми и прогениторными клетками .....	136
6.3 Результаты исследований гормонов крови в экспериментальной группе .....	137
6.4 Морфологические исследования тканей яичек в аллогенной группе .....	139
6.5. Исследование индекса сперматогенеза по Астраханцеву–Соловьеву .....	140
6.6 Исследование фертильности крыс линии Campbell .....	142
6.7 Иммуногистохимический маркерный анализ в группе животных, получавших терапию культурами аутологичного происхождения .....	142

6.7.1 Иммуногистохимическая характеристика тканей реципиента после аутологичной терапии культурами, обогащенными стволовыми / прогениторными клетками.....	143
6.7.2 Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс на ранних сроках (до 28 дня наблюдения).....	143
6.7.3 Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс Cambell на поздних сроках (90-120 дни наблюдения).....	144
6.7.4 Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс группы контроля на поздних сроках (90-120 дни наблюдения).....	146
6.8 Заключение.....	147

## Глава 7 ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ:

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕРАПИИ КУЛЬТУРАМИ, ОБОГАЩЕННЫМИ СТВОЛОВЫМИ / ПРОГЕНИТОРНЫМИ КЛЕТКАМИ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЛИЯНИЯ ИНДУКТОРОВ СПЕРМАТОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ, ФАКТОРА БИЛАТЕРАЛЬНОСТИ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ДОЗЫ .....	149
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

7.1 Исследование особенностей репарационных процессов после терапии обогащенными клеточными культурами в зависимости от фактора билатеральности.....	149
7.1.1 Исследования уровней гормонального профиля в группах, перенесших одностороннюю и двухстороннюю терапию обогащенными клеточными культурами .....	149
7.1.2 Исследование морфологических изменений в группах Моно и Би.....	151
7.1.3 Исследование индекса сперматогенеза по Астраханцеву–Соловьеву в группах Моно и Би .....	152
7.1.4 Исследование фертильности в группах Моно и Би.....	154
7.2 Определение минимальной терапевтической дозы у животных, получивших терапию обогащенными клеточными культурам ксеногенного происхождения.....	155
7.2.1 Популяционная характеристика исследуемых групп.....	155
7.2.2 Исследования уровней гормонального профиля в группах, участвующих в исследовании минимальной терапевтической дозы.....	155
7.2.3 Исследование морфологических изменений в дозозависимых группах .....	156
7.2.4 Исследование индекса сперматогенеза по Астраханцеву–Соловьеву в дозозависимых группах.....	157
7.2.5 Исследование фертильности в группах .....	158

7.3 Исследование влияния различных индукторов сперматогенной дифференцировки прогениторных клеток на поведение клеток после их трансплантации.....	160
7.3.1 Изучение действия индукторов дифференцировки для сингенной, аллогенной и ксеногенной клеточной культуры .....	160
7.3.2 Методология изучения эффекта введения аутологических и аллогенных культур клеток, индуцированных стимуляторами А и В.....	161
7.3.3 Иммуноморфологическое изучение эффекта введения аутологических и аллогенных культур клеток, индуцированных стимуляторами А и В.....	162
7.4 Специфичность маркерной оценки культур, обогащенных стволовыми / прогениторными клетками, которые использованы в работе .....	164
7.4.1 Маркерный анализ трансформации и дифференцировки сперматогенных стволовых клеток при оценке результатов терапии клеточными культурами ксеногенного происхождения .....	164
7.5 Оценка жизнеспособности клеточных культур <i>in vivo</i> , в тканях реципиента, после использования терапии, обогащенной стволовыми и прогениторными клетками, а также контроль их распространения по тканям и органам в течение всего времени жизни культуры .....	168
7.6 Использование нового биоматериала на основе продуктов секреции мезенхимных стволовых клеток человека и коллагена для восстановления сперматогенеза на модели экспериментального крипторхизма .....	172
7.6.1 Получение секрета мезенхимальных стромальных стволовых клеток жировой ткани.....	173
7.6.2 Результаты .....	175
Глава 8 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	186
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	212
ВЫВОДЫ.....	219
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	221
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	222
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	223
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	225
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	242
Приложение А (справочное). Патент № 2408378 С2 .....	242
Приложение Б (справочное). Патент № 2653779 С1.....	243
Приложение В (справочное). Патент № 2652902 С1 .....	244

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Проблема поиска новых средств восстановления фертильности у мужчин является одной из важнейших задач, стоящих перед современной медициной. Проживание в условиях хронического ухудшения экологической обстановки на планете, проявлений парникового эффекта, перерасхода ресурсов и активизации источников различных излучений, а также особенностей образа жизни, привело к тому, что из года в год, из поколения в поколение происходит хроническое снижение качества мужского эякулята [173]. По статистике, на планете бесплодна каждая 6 супружеская пара, и доля мужского фактора при этом составляет до 50% [4, 41]. За последние 60 лет минимальное пороговое значение нормы спермограммы по данным Всемирной Организации Здравоохранения снизилось в 5 раз (с 60 до 12 миллионов сперматозоидов в 1 миллилитре). По данным последнего пересмотра нормативов спермограммы, с учетом критериев Крюгера, репродуктологи вынуждены считать фертильным пациента, имеющего всего 4% нормальных сперматозоидов. Некоторые авторы определяют даже средние темпы потерь пула сперматозоидов, до 2,1% ежегодно [71, 193].

Помимо внешних социальных, экологических и демографических причин на мужской фактор фертильности оказывают влияние привычные интоксикации, стрессы, особенности поведения и другие факторы [155], что приводит к большим трудностям, в разработке адекватных методов восстановления сперматогенеза, за счет коморбидности, полиэтиологичности, а также функциональной взаимосвязи мужских гонад со всеми системами и органами. Кроме того, время от времени, появляются новые заболевания, которые также способны оказывать влияние на репродуктивную функцию [44].

В последние годы, появившиеся инновационные методики лечения, такие как нанотехнологии, генная инженерия, терапия стволовыми клетками, и успехи их применения, о которых периодически сообщается в мировой печати, заслуживают пристального внимания и могут рассматриваться в качестве перспективных методов для лечения мужского бесплодия.

Терапия культурами, обогащенными стволовыми и прогениторными клетками различных видов и происхождения, является динамично развивающимся и приоритетным направлением во всем мире. На данный момент в России официально зарегистрировано и уже применяется более 40 клеточных технологий [12]. Возможности данной терапии во многих областях медицины, таких как гематология, онкогематология, косметология, комбустиологии и прочих областях регенеративной медицины.

23 июня 2016 года Президент России В.В. Путин подписал Федеральный закон «О биомедицинских клеточных продуктах», имеющий важнейшее значение для дальнейшего развития клеточной биологии и регенеративной медицины. Законом регулируются отношения, связанные с разработкой, исследованиями, экспертизами, государственной регистрацией, производством и медицинским применением клеточных продуктов. Федеральным законом определяются основные принципы осуществления деятельности в сфере обращения клеточных продуктов, в частности, определяется порядок проведения доклинических, клинических и международных многоцентровых клинических исследований; порядок государственной регистрации клеточных продуктов; правила организации производства и контроля качества клеточных продуктов; особенности оказания медицинской помощи с применением клеточных продуктов и множество других вопросов.

Несмотря на то, что в данной области накоплен достаточно обширный объем знаний и многие вопросы касающиеся образования, развития и дифференцировки стволовых сперматогенных клеток неплохо изучены и освещены в специальной литературе, исследовательская активность по данной тематике остается крайне высокой. В настоящее время накоплен значительный материал о различных аспектах возможного применения культур, обогащенных различными видами стволовых клеток (сингенных, аутологичных и т.д.) для восстановления фертильности у мужчин. Полученные результаты дают определенные надежды и перспективны для дальнейшего изучения. Эффективность трансплантации, при пересадке культур, обогащенных сперматогенными стволовыми клетками у животных, в различных вариантах по разным данным, колеблется от 18 до 80% [14, 115, 116]. Большая разница в показателях, полученная при оценке результатов этих исследований, отсутствие стандартных методик выделения, культивирования трансплантации, отсутствие системы контроля, достоверной оценки эффективности результатов и изучения эффекта терапии культурами, обогащенными стволовыми и прогениторными клетками, обуславливают актуальность выбранной темы, как с научной, так и с практической точки зрения.

### **Степень разработанности темы исследования**

Изучение возможностей использования сперматогониальных стволовых клеток для коррекции нарушений сперматогенеза наиболее активно начало развиваться с начала 90-х годов [45, 99, 115, 116]. Эти исследования выполнены на различных животных моделях с использованием различных типов обогащенных клеточных культур, различных факторов роста, дополнительных стимуляторов. Используемые протоколы испытаний дают представление о существенных различиях в экспериментальных протоколах, касающихся различных условий



маркирования, культивирования, выделения, стимулирования, введения и контроля [39, 127]. Сообщения о клинической апробации касаются только единичных случаев и не могут предложить универсального варианта клинической апробации. Большинство имеющихся публикаций о проведенных экспериментальных исследованиях, несмотря на огромный пул различных технических сложностей, а также ряд этических, моральных, юридических и технологических вопросов, отмечают перспективность изучения данного направления, но отсутствие универсальности выбора технологии часто затрудняет интерпретацию имеющиеся функциональных результатов них клиническую апробацию [72, 160].

Опираясь на собственные работы (Охоботов Д.А., с соавт., 2007-2021), а также на работы отечественных и зарубежных авторов нам представилось важным изучение эффективности, биологической и клинической безопасности исследуемых методов лечения мужской фертильности с помощью обогащенных клеточных культур и их продуктов. Для выполнения одной из главных задач исследования, основанной на большом клиническом материале, были проанализированы результаты лечения 292 пациентов с клинически значимыми нарушениями в спермограмме 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, 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, 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. Эффективность препарата подтверждена 6 клиническими примерами, которые описаны в третьей части работы. Анализ и статистическая обработка полученных результатов проведены

с помощью методов непараметрической статистики для малых групп и программы Statisticav.12. Полученные результаты подтверждают то, что уже при нынешнем уровне развития науки, технологии, использующие возможности регенеративной медицины способны исправлять повреждения сперматогенеза у мужчин. Объем и анализ полученных данных в достаточной мере обосновывает выводы, полученные автором научной работы. Изучение, внедрение и адаптация высокотехнологичных регенеративных методов лечения нарушений сперматогенеза, позволит обеспечить индивидуальный подход в урологической, андрологической и репродуктологической практике, так как из имеющихся вариантов аутологический вариант вызывает наименьшее количество вопросов.

Таким образом, тема настоящей диссертационной работы представляется актуальной и может быть применена в репродуктологии, на базе клиник мужского и репродуктивного здоровья и исследовательских центров, но ряд вопросов, касающихся различных клинических аспектов регенерации поврежденных тканей яичка путем имплантации культур, обогащенных стволовыми и прогениторными клетками, а также их факторами роста, остается недостаточно изученным, что и послужило основанием для выбора научной темы и выполнения данной работы.

### **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 infertility у пар с мужским фактором infertility. Проанализированы неудачи и дан процентный прогноз на получение беременности в паре, где мужчины имеют то или иное заболевание, в том числе воспалительных заболеваниях простаты (патент РФ № RU2408378C2 «Способ лечения хронического простатита», Приложение А), 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», Приложение Б). 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», Приложение В).

### **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 infertility.
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 секретама стволовых и прогениторных мезенхимальных клеток жировой ткани человека создан стимулирующий препарат, который в настоящее время проходит 1 фазу клинических испытаний.

### **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.

### **Апробация результатов работы**

Результаты работы доложены на VI, VII, XI, XII, XIII и XIV Конгрессах «Мужское здоровье» с международным участием (Москва, 16-18 июня 2010 года; Ростов-на-Дону, 26-28 апреля 2011 года; Сочи, 27-30 апреля 2015 года; Казань, 16-18 июня 2016 года; Кисловодск, 26-28 апреля 2017 года, Сочи, 27-29 апреля 2018 года); пленуме Российского общества урологов (Москва, 6-8 ноября 2013 года); IV научно-практической конференции «Фундаментальная и практическая урология» (Москва, 4-5 марта 2015 года); IV съезде детских урологов – андрологов (4-5 апреля 2015 года); XVI Всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов (14-17 июня 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); на конференции StemCellBio 2016 (Санкт-Петербург, 9-11 ноября 2016 года); Парк отель Кранкино, Зеленоград; Сеченовском Международном Биомедицинском Саммите 2017 (СМБС-2017) (Москва, 16-20 июня 2017 года); XIII Съезде и XVII конгрессе Российского общества урологов (РОУ) (8-10 ноября 2017 года); III национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 15-18 ноября 2017 года); XVI Конгрессе «Мужское здоровье» с международным участием. Россия (Москва, 26-28 июня 2020 года); XX Конгрессе

Российского общества урологов. Online (26-29 ноября 2020 года); XVII и XIII Конгресс «Мужское здоровье» с международным участием. Россия (Сочи, 27-29 апреля 2021, 2022 год).

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 ФГБОУ 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 75 печатных работ, из них 23 в изданиях, из списка, рекомендованного ВАК РФ.

### **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.

Является автором и соавтором 75 печатных работ, автором более 15 докладов на медицинских форумах, соавтором трех патентов РФ.

### **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.

# Глава 1

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ

### 1.1 Эпидемиология и этиология мужского бесплодия

Проблема бесплодия в супружеской паре сегодня является одной из важнейших социально значимых проблем мирового уровня. В мире имеется достаточно большое количество стран с высоким уровнем жизни, которые сегодня столкнулись с репродуктивной проблемой вплотную, например, Япония, в которой по прогнозам Всемирной Организации Здравоохранения, численность населения в течение ближайших 50 лет может уменьшиться на 40 миллионов граждан. Сегодня численность населения Японии упала на 0,17% при том, что страна поддерживает один из самых низких уровней рождаемости, а граждане в возрасте старше 65 лет составляют четверть населения [113, 193]. Развитым странам Европы удастся поддерживать рост населения в основном за счет миграционных потоков из стран Африки, Азии и Восточной Европы, тем не менее, сегодня в 14 странах Евросоюза, в основном Восточной Европы, имеется серьезный отрицательный прирост. В Португалии и Италии смертность превышает рождаемость уже с 2008 года, с каждым годом диспропорции нарастают. По данным Евростата, в 2013 году в Евросоюзе естественный прирост населения составил 0,2 миллионов человек, а за счет прибытия мигрантов на 0,9 миллионов человек [101]. В России по данным последней переписи населения 2010 года, по сравнению данными переписи 2002 года, выявлено сокращение населения на 2,3 миллиона человек, причем доля миграционных пополнений составила 59,4% [20]. Присоединение Крыма и миграция из разоренных войной восточных областей Украины добавила к численности населения еще около 3,0 миллионов человек. Тем не менее, за период январь – июнь 2014 года (с учетом Крыма) общая убыль населения РФ составила 28 643 человека, при условии ежегодного пополнения за счет мигрантов до 295 000 человек ежегодно [20].

Сегодня под бесплодием понимают отсутствие беременности у женщины в сексуально активной паре, не использующей противозачаточные средства в течение 1 года и более. Бесплодие может проявляться при снижении фертильности как у одного, так и у обоих партнеров. Под фертильностью понимают способность к зачатию и вынашиванию беременности у женщин и способностью к зачатию у мужчин.

Этиология мужского бесплодия весьма разнообразна. Причинами развития бесплодия у мужчин являются различные виды нарушений, включающие врожденные и приобретенные



аномалии органов мочевыделительной и половой системы, инфекции и воспалительные заболевания мочеполовой сферы, эндокринные нарушения, генетические, иммунологические, социальные и другие причины. Например, по данным ФСГС в РФ только 26,14% населения является сельским, остальные – жители городов, в том числе мегаполисов, то есть, сосредоточены на ограниченных площадях и подвергаются сочетанному воздействию неблагоприятных факторов урбанистической культуры [20].

В 30% случаев бесплодие вызвано мужским фактором, в 35% – женским, в 15% случаев обусловлено заболеваниями у обоих партнеров, и в остальных случаях (30-75%) причину бесплодия установить не удастся [70]. Иногда инфертильность может быть связана с одновременным действием сразу нескольких факторов, включая хронический стресс, последствия загрязнения окружающей среды, перекисное окисление и генетические нарушения, нарушение протеомной структуры мембраны сперматозоида и другие [35].

Сегодня наиболее частой причиной является идиопатическое мужское бесплодие. По статистике до 31,0% мужчин имеют инфертильность неизвестные причины бесплодия [71]. Тем не менее, за последние 10 лет достижения иммунологии, эндокринологии, исследования ультраструктурной морфологии сперматозоидов, изучение генетических факторов и аномалий позволило снизить частоту идиопатических форм с 70,1 до 31,0% [17, 91, 100].

Исследование сочетанного влияния различных факторов на качество сперматогенеза также является областью, которая сегодня активно изучается, причем все неблагоприятные факторы можно условно разделить на 3 группы: химические, физические и бытовые.

*Химические соединения:* наибольшее негативное влияние на сперматогенез оказывают соединения, которые демонстрируют эффект сходный с действием эстрогенов или веществ блокирующих андрогеновые рецепторы. Эти соединения нарушают процессы эндокринной регуляции гаметогенеза и стероидогенеза, а также способны проявлять антиандрогенную активность в мужском организме (фитоэстрогены, компоненты топлива и продукты распада нефтепродуктов, пестициды, инсектициды и фунгициды (например, ДДТ) [4, 105]. Попадая в организм эти вещества способны оказывать токсический угнетающий эффект на клетки сперматогенного эпителия, а также на центральные механизмы регуляции сперматогенеза (гипоталамус, гипофиз), а также метаболизм других репродуктивных органов (простата, семенные пузырьки, придатки яичек).

Такой эффект можно наблюдать при хронической интоксикации тяжелыми металлами, нейротропными ядами (например, фенол). Кроме того, многие лекарственные препараты, применяемые в клинической практике в различных областях медицины, способны оказывать угнетающий эффект на сперматозоиды. К ним относятся седативные средства и антидепрессанты, некоторые антибиотики, гиполипидемические средства, кетоконазол,

диуретики, гормоны (эстрогены, андрогены), гипотензивные препараты, блокаторы гистаминовых рецепторов (противоязвенные препараты), средства химиотерапии опухолей и другие [4, 117].

*Физические факторы:* наиболее выраженное отрицательное воздействие на сперматозоиды оказывают изменения температуры, вибрация и воздействие различных видов ионизирующего облучения. Сперматогенный эпителий очень чувствителен к температурным изменениям, поэтому яички находятся в мошонке, где температурный режим для них наиболее комфортен и, при необходимости, может быть скорректирован изменением местоположения. Повышенная температура оказывает повреждающее воздействие на его количественные и качественные показатели и вызывает подавление сперматогенеза. Подобную картину нарушений можно наблюдать при крипторхизме и варикоцеле [174, 183].

Ионизирующее излучение, особенно если воздействие долгосрочно, также способно оказывать неблагоприятное воздействие на сперматогенез [72, 143].

Такой неприятный фактор как вибрация является профессиональной вредностью у рабочих на производстве. Вибрация, может приводить к тератоспермии и астенизации сперматозоидов. Встречаются сообщения, в которых сообщается о том, что при ней возникает как дисбаланс гормонов, на фоне с гиперпродукции кортикостероидов [41].

*Привычные интоксикации:* наиболее выраженное негативное воздействие на сперматогенез оказывают курение, в меньшей степени, длительный прием алкоголя и наркотических анальгетиков [75]. Алкоголь создает предпосылки к психосоматической деградации, вторично вызывая тяжелые нарушения не только процессов сперматогенеза, но и вызывая серьезные повреждения протерматогенных стволовых клеток, нарушая функцию клеток Лейдига, которые контролируют метаболизм половых стероидов, в дальнейшем поражая все органы гипоталамо-гипофизарной системы. Морфологически в тестикулярной ткани пациентов с хроническим алкоголизмом выявляется атрофия клеток Лейдига и отек извитых семенных канальцев, сопровождающийся тотальной потерей сперматогенных клеток, вплоть до полного блока – синдрома «только клетки Сертоли». У этих пациентов снижается содержание зрелых и подвижных сперматозоидов, нарастает тератозооспермия, появляются признаки фиброза яичка [157]. Подобная картина, по данным некоторых авторов отмечается у 54-74% пациентов, страдающих хроническим алкоголизмом, причем более 80% хронических алкоголиков имеют тяжелые повреждения сперматогенеза, вплоть до азооспермии [68].

Наиболее неприятные нарушения спермограммы возникают при возникновении оксидативного стресса на фоне курения. Окислительный стресс происходит, когда существует дисбаланс функции внутренних антиоксидантных систем, который не позволяет в полной мере компенсировать молекулам донаторство необходимых для электрической стабильности

внешних электронов, вследствие их значительных потерь при повреждении свободнорадикальными окислителями, и в первую очередь активными формами кислорода (АФК), в результате чего происходит повреждение клеток и тканей [96, 150, 154]. Активные формы кислорода – это свободно радикальные молекулы, которые в процессе некоторых метаболических реакций лишаются одного парного электрона и, в процессе поиска недостающего электрона, стараются отобрать его у клеток и тканей, окисляя при этом электростабильные соединения, в частности, белки, нуклеиновые кислоты, липиды, клеточные мембраны, ДНК и РНК [74, 131].

У пациентов, которые курят, часто встречается сопутствующая гипотестостеронемия, на фоне вторичной дисфункции клеток Лейдига. Кроме того, в яичке параллельно идет повреждение функции клеток Сертоли, вследствие которой появляются нарушения в виде снижения количества сперматозоидов в эякуляте, их подвижности и оплодотворяющей способности. При этом может нарастать доля тератозооспермии, в то время как популяция морфологически, генетически и функционально нормальных клеток серьезно теряет в численности [117, 182]. Этот эффект связывают с значительным оксидативным стрессом, продукты которого оказывают прямое цитотоксическое влияние на сперматогенные клетки [68, 77, 83, 123].

При систематическом употреблении наркотиков, также встречаются тяжелые расстройства сперматогенеза в виде олигоастенозооспермии, тератозооспермии или некроспермии. Ультроструктурное микроскопическое исследование выявляет выраженные дегенеративные изменения практически всех структур зрелых сперматозоидов [81].

*Психоэмоциональные факторы:* В литературе встречаются сообщения о том, что у пациентов на фоне депрессии или живущих в состоянии хронического стресса часто встречаются нарушения сперматогенеза. Эти же факторы приводят к снижению уровня тестостерона и дегидроандростерона при повышении концентраций кортикостероидов [132, 140].

Большой интерес представляет классификация причин мужского бесплодия в зависимости от локализации преимущественного повреждения гормонорегулирующих и гормонопродуцирующих механизмов [156]. В частности, при поражении органов, регулирующих функцию яичек, нарушения сперматогенеза встречаются при заболеваниях гипоталамуса (синдромы Калманна, недостаточность синтеза ФСГ и ЛГ, Прадера–Вилли, Лоренса–Муна–Бидля) и гипофиза (гипофизарная недостаточность, гиперпролактинемия, гемохроматоз, гипо или гипертиреоз). Непосредственное поражение на уровне яичек, ведущее к инфертильности встречается при хромосомных аномалиях (синдромы Клайнфельтера, Нунана, атрофической миотонии, анорхии, дисплазии), при токсических воздействиях (отравления

пестицидами, свинцом, химиотерапии, ионизирующем облучении, при травмах и воспалительных заболеваниях, системных заболеваниях (ХПН, саркоидоз) и некоторых аномалиях (крипторхизм, варикоцеле и т.д.) [73, 110]. Поражение сперматозоидов и семявыносящих путей вызывается врожденными (например, при муковисцидозе) или приобретенными инфекционными (хламидии, гонококк) или функциональными факторами (ретроградная эякуляция, после трансуретральной резекции простаты или при приеме альфа-адреноблокаторов) [53]. Нарушение подвижности сперматозоидов или их способности к оплодотворению может возникать при синдроме Картагенера, иммунологическом факторе бесплодия, при ускоренном апоптозе [117].

Естественно, что при различных формах infertility патогенез и клиническая картина нарушений сперматогенеза может существенно различаться [125]. Некоторые из них сочетаются с выраженными клиническими проявлениями, например, на фоне гормонального дисбаланса при гипогонадизме, но, в большинстве случаев, нарушения сперматогенеза протекают бессимптомно, не являются жизнеугрожающими и экстренными факторами для интенсивного лечения, и выявляются при обследовании по поводу бесплодного брака в течении нескольких лет [144]. Эти особенности достаточно подробно описаны в соответствующих руководствах и литературных источниках, и дополнительного освещения не требуют.

## **1.2 Диагностика мужского бесплодия**

Перед началом лечения необходимо обследовать пару, получив информацию о предыдущих беременностях и родах у женщины и репродуктивном анамнезе у мужчины. Перед применением тех или иных интервенционных вмешательств в мужской организм следует оценить прогностическую возможность зачатия и вынашивания беременности женщиной. Мужчина с нарушениями в спермограмме, должен быть подробно обследован для исключения сопутствующих заболеваний мочеполовой сферы.

Соответственно методы первичной диагностики мужского бесплодия делятся на общеклинические, лабораторные и инструментальные. Начинается любое обследование со сбора репродуктивного анамнеза у обоих партнеров, общего осмотра мужчины, с привлечением по показаниям для консультаций генетика, терапевта, сексопатолога и других специалистов.

### ***1.2.1 Первичный прием***

При этом следует обращать внимание, помимо отсутствия наступления спонтанной беременности более 1 года, на любые ухудшения самочувствия, расстройства вегетативной нервной системы в виде слабости, утомляемости, нарушений сна, снижения работоспособности, раздражительность, и т.д. Большое значение имеют неконтролируемые изменения массы тела, нарушение оволосения, снижение темпа роста бороды и усов, встречающуюся эректильную функцию. Дополнительного внимания потребуют боли различной продолжительности с локализацией внизу живота, в области поясницы и промежности, а также любые неприятные ощущения в виде дискомфорта или тянущей боли в мошонке, например, при варикоцеле, особенно часто возникающие после длительной физической нагрузки, болезненное и затрудненное мочеиспускание. Желательно выяснить семейно-репродуктивный анамнез, выявить возможные факторы наследственности, и перенесенные заболевания. Обязательно следует уточнить формат сексуальной жизни, все параметры копулятивного цикла, учесть возможное повреждающее влияние хронических интоксикаций, в том числе привычных.

### ***1.2.2 Дополнительные методы диагностики***

К лабораторным и инструментальным методам диагностики мужского бесплодия относятся исследование спермограммы, выполненной на сперманализаторе или микроскопическим способом, УЗИ органов малого таза, исследование на наличие сопутствующих инфекций, таких как хламидиоз, микоплазмоз, уреаплазмоз, вирус простого герпеса, цитомегаловирус. При необходимости, дополнительно могут использоваться цитология секрета простаты и семенных пузырьков, определение антиспермальных антител (MAR-тест, FISH-гибридизация), бактериологический анализ спермы, гормональный скрининг, УЗИ щитовидной железы, эходоплерография, МСКТ, томография черепа, медико-генетическое обследование, почечная флебография, исследование на свободные радикалы кислорода в эякуляте (окислительный стресс), исследование на апоптоз сперматозоидов, ультраструктурные исследования морфологии сперматозоидов (NASUM, ЭМИС, TUNEL) и другие методы [71, 97].

### *1.2.2.1 Спермограмма*

Следует помнить, что при исследовании формулы эякулята, вследствие хронического ухудшения его качества по всему миру, желательно ориентироваться на данные ежегодно представляемые Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ). За последние 60 лет ВОЗ более 5 раз пересматривала нормативы сперматологической картины эякулята, так как общее ухудшение по отдельным параметрам составило более 70% [192]. Сегодня стандартизация показателей спермограмм в различных лабораториях практически отсутствует и зависит от их технического оснащения и квалификации персонала [192]. Стандартизация по критериям Крюгера используется не во всех центрах и не решает проблемы стандартов.

Рекомендованная гайдлайнами относительно высокая стабильность показателей сперматогенеза для каждого пациента позволяет при условии нормозооспермии ограничиться достаточным обследованием в виде одного анализа спермы [71]. При наличии любой патозооспермии анализ спермы выполняется два раза в период 1-3 недели с предварительным половым воздержанием от интимной жизни не менее 3, но и не более 5 дней. При выявлении клинически значимой разницы в анализах спермограммы выполняется 3-й. Сбор эякулята осуществляется при помощи мастурбации в пробирку или специальный презерватив. В ситуациях, когда отсутствует спермапри оргазме, выполняется микроскопическое исследование осадка посторгазменной мочи полученного при центрифугировании для выявления в ней сперматозоидов. Их обнаружение свидетельствует о наличии ретроградной эякуляции.

### *1.2.2.2 Исследование взаимодействия сперматозоида и яйцеклетки*

Для определения функциональных нарушений, возникающих на фоне взаимодействия сперматозоидов с ооцитом разработан ряд специальных функциональных тестов. В репродуктологических клиниках для этого используются исследования акросомной реакции, тест проникновения сперматозоидов сквозь блестящую оболочку ооцита, тест связывания сперматозоидов с блестящей оболочкой ооцита (HZA – hemizona assay), определение деконденсации хроматина ядра сперматозоида методом окраски анилиновым синим, а также тест проникновения сперматозоидов в ооцит, лишенный оболочки.

### *1.2.2.3 Ультроструктурные методы исследования сперматозоидов*

При диагностике патозооспермии, особенно тератозооспермии или олигозооспермии тяжелой степени, для оценки функционального состояния сперматозоидов может быть применена методика ультроструктурного анализа (NASUM, ЭМИС), поскольку в большинстве случаев нарушение ряда функциональных свойств сперматозоидов при обычном светомикроскопическом исследовании обнаружить не удастся [185].

### *1.2.2.4 Эндокринологическое обследование*

При подозрении на скрытые эндокринные нарушения для уточнения причины infertility необходимо определение в крови половых гормонов: ФСГ, ЛГ, пролактина, эстрадиола, ГСПГ и тестостерона. Дополнительно может быть применено исследование Ингибина Б, Антимюллерова гормона и ТТГ.

Определение уровня ФСГ в крови, выполняемое для дифференциальной диагностики гипогонадизма, имеет большое прогностическое значение в случаях, когда варикоцеле сочетается с патозооспермией, поскольку высокая концентрация ФСГ не позволяет надеяться на восстановление фертильности. ФСГ и Ингибин Б сегодня являются, пожалуй, самыми важными маркерами функционального состояния сперматогенного эпителия [111, 191].

### *1.2.2.5 Иммунологическое исследование*

Сперматозоид состоит из более 2000 различных спермальных антигенов (САГ), отвечающих за специфические реакции и различные виды жизнедеятельности. На любой из этих белков могут быть выявлены антиспермальные специфические антитела (АСАТ). Классическими методами, определяющими уровень АСАТ являются твердофазный иммуноферментный анализ, радиоиммунный анализ, и иммуноглобулиновый тест на полиакриловых микросферах (ИВТ). Сегодня описано уже более 200 различных антигенов, на которые могут быть выявлены специфические антиспермальные антитела (YWK-II, BE-20, rSMP-B, EP-20, SAGA-1, и другие). В медицинской литературе сообщается о выявлении некоторых антигенов сперматозоидов, антитела к которым обладают клинически значимой

агглютинирующей и иммобилизирующей активностью. Все они проявляют выраженное антигенное сенсibiliзирующее воздействие, способное вызывать образование антител, ассоциированных с мужским бесплодием, значительно ухудшающих фертильность экспериментальных животных или влияющих на процесс оплодотворения *in vitro*. Таким образом, иммунологическое бесплодие скорее всего связано с комбинированным воздействием различных антиспермальных антител к множеству антигенов на мембране сперматозоидов.

К методам диагностики иммунологического бесплодия, связанного с наличием АСАТ в спермоплазме и цервикальной слизи, является посткоитальный тест. Этот тест определяет взаимодействие сперматозоидов со слизью цервикального канала, который проводится в двух вариантах *in vivo* (проба Шуварского-Симса-Хюнера) и *in vitro* (проба Курцрока-Миллера). Более широко распространен MAR-тест, который определяет процент сперматозоидов, связанных с антителами классов IgG и IgA (прямой MAR-тест) и титр антиспермальных антител в различных биологических жидкостях (спермоплазма, слизь шейки матки, плазма крови) (непрямой MAR-тест). Этот тест являясь международно признанным стандартом диагностики АСАТ обладает очень высокой специфичностью, но не всегда высокой чувствительностью. Кроме того, для диагностики иммунного фактора инфертильности используется Immunobead-тест, который является аналогом MAR-теста, основанном на использовании других реактивов. Разницей в техническом оснащении может быть объяснено расхождение между результатами тестов у одного и того же пациента. Еще одним методом является иммуноферментный метод (ELISA), который используется для определения АСАТ в плазме крови [146]. Данный метод является дополнительным способом диагностики АСАТ. Интересно, что высокие титры АСАТ, определяемых методом ELISA в крови у женщин не всегда имеют прямую корреляцию с ухудшением прогноза наступления беременности [109].

Следует отметить, что несмотря на наличие отрицательного посткоитального теста, самой частой причиной этого факта является наличие АСАТ в сперме, а не с наличием АСАТ в цервикальной слизи. Что может существенно исказить результативность данной методики за счет увеличения количества ложных результатов. Поэтому посткоитальный тест требуется дополнять проведением дополнительных специальных исследований на АСАТ.

#### *1.2.2.6 Генетические факторы мужской инфертильности*

У мужчин аномалии кариотипа, микроделеции Y-хромосомы, а также ряд наследственных болезней могут приводить к нарушениям сперматогенеза, вплоть до



азооспермии. При этом наиболее частыми генетическими причинами нарушений являются структурные и численные хромосомные aberrации, а также нарушения в виде микроделеций на длинном плече Y-хромосомы. Частота встречаемости таких микроделеций по некоторым данным у мужчин с азооспермией достигает 30% [6, 62, 98, 158].

В настоящее время к медико-генетическим методам обследования относятся исследование локуса AZF (локуса азооспермии), выявление гетерозиготного носительства гена муковисцидоза (CFTR) [51] и исследование гена андрогенового рецептора [60].

AZF это небольшой участок длинного плеча Y – хромосомы, который получил название «фактор азооспермии». Расшифровка и построение физической карты Y-хромосомы позволило провести проведение микроделеционный анализ района Yq11 с целью поиска некоторых специфических последовательностей ДНК, имеющих корреляцию с нарушениями сперматогенеза, что позволило картировать в участке Yq11 4 неперекрывающихся локуса – AZFa, AZFb, AZFc и AZFd, микроскопические делеции в которых сопровождаются различными нарушениями сперматогенеза, в том числе достаточно тяжелыми [112, 138]. В дальнейшем в каждом из этих локусов был идентифицированы гены, которые предположительно принято считать «факторами азооспермии» – DFFRY (*Drosophila Developmental gene Fast Facets*) в AZFa, RBM (*RNA-Binding Motif*) в AZFb и DAZ (*Deleted in Azpospermia*) в AZFc [52, 103].

Пациенты, у которых при секвенировании выявляются делеции AZF, особенно AZFa и AZFb полностью бесплодны, и лишь вариант AZFc возможно выявление сперматозоидов, которые могут передать аномалию своего генотипа потомству только с помощью ЭКО. Использование сперматозоидов с микроделецией локусов AZF в протоколах ВРТ (ЭКО-ИКСИ) не приведет к рождению ребенка с врожденными пороками развития, но потомок мужского пола с высокой долей вероятности получит делецию, возможно, более протяженную, чем у отца, из-за «генетической нестабильности» Y-хромосомы и будет иметь ту же или более тяжелую форму нарушений сперматогенеза [29, 32].

Наиболее современные методы, выявляющие носительство гена муковисцидоза при бесплодии, относятся к молекулярно-генетической диагностике, которая позволяет выявить мутации в гене MBTP у пациента с данным заболеванием, провести дородовую диагностику в семьях больных. В основе заболевания лежит генная мутация. Патологический ген локализуется в середине длинного плеча 7-й хромосомы. Муковисцидоз наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Кроме того, анализ дает возможность определить гетерозиготное носительство мутаций в гене MBTP. Метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью (97-99,5%) [47, 51].

Согласно некоторым данным [142], ген, кодирующий андрогеновые рецепторы (AR) в положении Xq 11-12 расположен на хромосоме X и, при этом, содержит высокополиморфный

участок в 1-м экзоне САG-тринуклеотидов (САG-повторов), осуществляя при этом кодировку полиглутаминовой цепи на N-конце трансаактиваторного домена. В научной литературе последних лет [106] представлены исследования, свидетельствующие о существовании зависимости между количеством САG-повторов в гене AR и степенью функциональной активности андрогенового рецептора.

Для определения полиморфизма гена андрогенового рецептора и количественного подсчета САG-повторов в 1-м экзоне AR используется фрагментный анализ продуктов полимеразной цепной реакции [92].

Исследование фрагментации ДНК. Представляет отдельное направление в изучении некоторых патофизиологических механизмов, которые могут приводить к возникновению фрагментации ДНК сперматозоидов. Согласно данным С.А. Рудневой (2014) локусы фрагментации могут быть возникать при наличии дефектов ремоделирования хроматина, вследствие нарушения апоптоза и окислительного стресса. Интересно, что количество сперматозоидов с ДНК фрагментациями встречается чаще при тяжелых вариантах нарушений, чем при легких [164]. Мужчины, спермограмма которых имеет уровень сперматозоидов, имеющих фрагментацию ДНК выше 15%, обнаруживают корреляцию в снижении концентрации сперматозоидов, которая напрямую зависит от частоты встречаемости фрагментации ДНК в сперматозоидах [134]. Фрагментация ДНК определяется методом TUNEL на мазках эякулята [21, 161].

#### *1.2.2.7 Рентгенограмма черепа и турецкого седла*

Данный вид исследования используется при подозрении на опухоль гипофиза, которая может манифестировать гипергонадотропностью, гиперпролактинемией или клиникой гипоталамо-гипофизарной недостаточности [130].

#### *1.2.2.8 Трансректальное ультразвуковое исследование*

Трансректальное УЗИ может быть использовано при подозрении на полную или частичную обструкцию семявыносящих протоков, а также для оценки функционального состояния семенных пузырьков. Для подтверждения показаний к оперативному лечению варикоцеле используется трансперинеальное и трансабдоминальное УЗИ почек с эходопплерографией, а также УЗИ органов мошонки.

### *1.2.2.9 Вазография и мультиспиральная компьютерная томография*

В 60-70-х годах XX века для оценки проходимости семявыносящих протоков у больных с азооспермией, некоторые авторы предлагают использовать открытую или пункционную вазографию [114], но в связи с тем, что контрастирующие вещества сами по себе способны вызывать стриктуры семявыносящих протоков, в настоящее время данный метод практически не применяется [170]. Более точным методом диагностики различных анатомических и функциональных аномалий семявыносящих протоков и семенных пузырьков, является мультиспиральная КТ с моделированием изображения в режиме 3D.

### *1.2.2.10 Биопсия яичка*

Диагностическая и поисковая биопсия яичек и придатков может использоваться как самостоятельный метод, но при этом должна проводиться в клиниках, где используются вспомогательные репродуктивные технологии, чтобы сохранить полученный материал и в дальнейшем использовать его в протоколах ЭКО. При этом дается заключение о нормосперматогенезе, гипосперматогенезе и асперматогенезе. Интересно, что при обнаружении сперматозоидов присутствующий при операции эмбриолог дает заключение о целесообразности восстановления семявыносящих протоков на основе качественного и количественного анализа (более 10 сперматозоидов в поле зрения) имеющегося биоматериала [30]. Открытые варианты биопсии (TESA, TESE и т.д.) и пункционные варианты биопсии яичка представляют собой малотравматичные оперативные вмешательства, которые под местной анестезией выполняются в амбулаторных или стационарных условиях и могут использоваться для получения биоматериала для дальнейшей криоконсервации [102]. При этом сохраняется высокий риск развития иммунного фактора infertility, который, при повреждении гематотестикулярного барьера, может достигать 35% после каждого повреждения [146].

После получения сперматозоидов, они могут быть отправлены на криохранилище и длительно сохраняться в специальных криобанках более 20 лет [152]. Тем не менее, около 25% сперматозоидов необратимо повреждается во время самих процессов криоконсервации [163].

### 1.3 Лечение мужского бесплодия

#### *1.3.1 Немедикаментозное лечение*

Под не медикаментозным лечением подразумевается комплекс лечебно-организационных мероприятий, который позволяет минимизировать имеющиеся хронические интоксикации организма, улучшить режим труда и отдыха, сбалансировать питание, нормализовать ритм половой жизни и усилить контроль за лечением сопутствующих заболеваний. Снижение активности половой жизни способствует увеличению качественных и количественных характеристик эякулята, но приводят к увеличению доли патологических форм и астенизации сперматозоидов. При недостаточном воздержании (менее 3 дней) «фертильный пул» сперматозоидов может оказаться неэффективным, или, вообще быть ниже рекомендуемых критериев Крюгера. Оптимальным считается период воздержания от 3 до 5 дней. При подозрении на наличие антиспермальных антител, на фоне повреждения гематотестикулярного барьера, оправдано использование презерватива в дни кроме овуляции, в период не менее 3 месяцев, так как эякулят с АСАТ, в свою очередь, вырабатывает у женщины ответные антиспермальные антитела, максимальная концентрация которых содержится в цервикальной слизи, усугубляя развитие иммунного бесплодия у пары. В данном случае, половой акт без использования презерватива может происходить только в дни овуляции, когда вероятность зачатия максимальна.

#### *1.3.2 Планирование*

В репродуктивном периоде женский организм проходит регулярную ежемесячную гормонально зависимую цикличность – менструальный цикл. У пары имеется всего лишь короткий временной промежуток, когда возможно зачатие. «Фертильное окно» овуляторного периода, может длиться от 2-3 часов до 1 суток. В остальное время интенсивное «осеменение» к успеху не приведет. Менструальный цикл состоит из 3 фаз, включающий периоды до и после выхода яйцеклетки и собственно овуляцию, и для правильного определения максимальной вероятности зачатия необходимо соблюдать ряд правил. Учитывая то, что сперма наиболее «фертильна» на 3-5 день воздержания, и количество сперматозоидов, количество категорий А+В в этот период максимально, данный факт может рассматриваться в качестве одной

из базовых составляющих, необходимых для успешного зачатия. Основным смыслом планирования состоит в наиболее точном определении времени овуляции. Учитывая то, что лютеиновая фаза – это наиболее стабильная часть цикла и составляет в среднем 14 дней, то пользуясь календарным методом можно установить время овуляции с точностью до 1 дня. Кроме того, для установления времени овуляции могут использоваться тесты на овуляцию, измерение базальной температуры и УЗИ контроль. Соответственно, зная календарный план овуляций, имея данные о зрелости эякулята, необходимо планировать интимную жизнь таким образом, чтобы соитус состоялся во время овуляции, и эякулят был максимально фертильным. Сексуальная жизнь за 4-5 дней до овуляции должна быть прекращена, в этот период максимально должны быть ограничены привычные интоксикации, диетические и температурные провокации, а половой контакт должен быть осуществлен однократно. Кроме того, учитывая вероятность физиологических подвижек цикла (1-2 дня) и дня овуляции ( $\pm 1,5$  суток) у женщин, планирование беременности иногда может представлять достаточно сложную задачу. Как указано на примере (рисунок 1), при цикле в 28 дней, определяемая дата выхода яйцеклетки – 14 день.

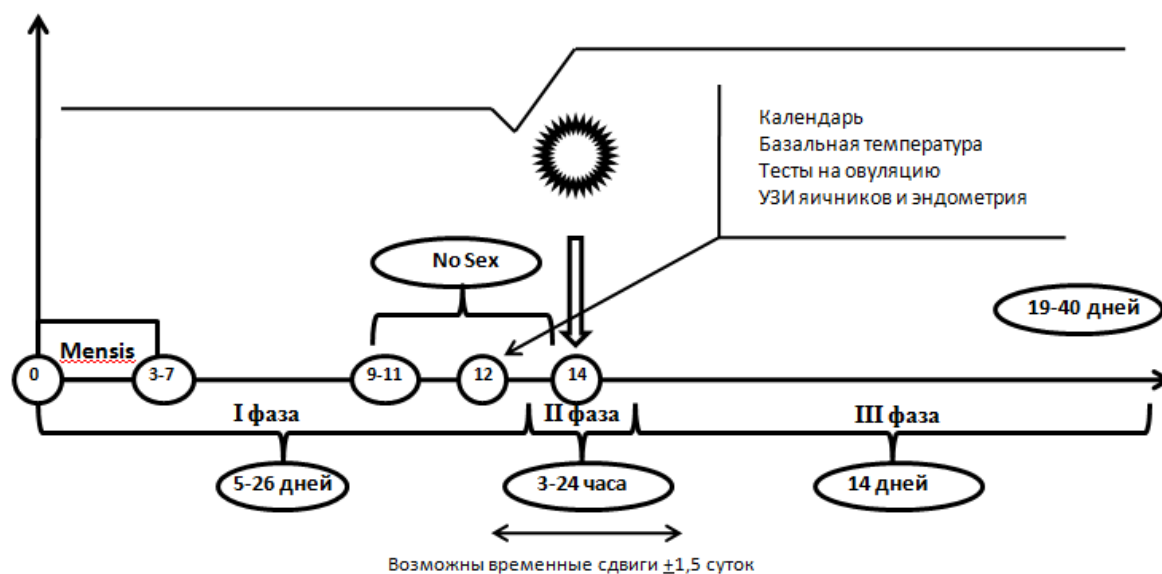


Рисунок 1 – Расчет дней вероятного зачатия

Соответственно, день вероятного зачатия – 14, но при наличии подвижек может быть смещен на 13 или 15. Учитывая то, что время жизни яйцеклетки составляет в среднем 12-18 часов (максимально 24 часа), это смещение  $+1,5$  дня приводит к серьезному смещению даты овуляции, а пара теряет очередной репродуктивный цикл [180]. Режим интимной жизни, с нашей точки зрения, будет оптимален по схеме 1 раз в день. Есть некоторые данные о том, что проведение повторного контакта в день овуляции может повысить вероятность зачатия

в среднем на 10% [133]. После интимного контакта женщине лучше полежать на боку или на спине, для уменьшения потерь биологического материала, в течение 15 минут. За это время фертильный сперматозоид должен достигнуть конечной точки [136].

### ***1.3.3 Диетотерапия***

В идеале питание при нарушениях сперматогенеза у мужчин должно быть полноценным, калорийным и, по возможности, регулярным, содержащим необходимое количество углеводов, жиров, белков, витаминов и микроэлементов [56]. Для синтеза половых гормонов и нормальной функции сперматогенного эпителия особенно важны жирорастворимые витамины А, С и Е, которые играют важную роль в метаболизме митохондрий, а также фолиевая кислота, которая практически не вырабатывается в организме, но неплохо усваивается, поступая в организм с продуктами растительного происхождения [177]. При этом не рекомендуется употребление острых блюд, приправ и копченостей. Для улучшения метаболической и антитоксической функций печени, рекомендуется использование таких препаратов как: карсил, эссенциале-форте, лив-52, а также некоторые аминокислоты: метионин, глутаминовую и линолевую [171].

### ***1.3.4 Физиотерапия***

Назначение физиотерапии при лечении infertility не всегда оправдано. В частности, из большой когорты заболеваний, при которых встречается infertility, физиотерапия оправдана только лишь тогда, когда она возникла на фоне имеющегося хронического простатита и воспаления придаточных половых желез. В других случаях, например, при системных заболеваниях, она не показана и может быть даже вредна. Для лечения хронического простатита могут применяться электростимуляция, магнитотерапия, низкоинтенсивное лазерное излучение, по показаниям, массаж предстательной железы. Данные методы способны вызывать следующие эффекты: улучшение микроциркуляции и повышение тонуса гладкой мускулатуры простаты, восстановление эвакуаторной и секреторной функции простаты, улучшение половой функции, противовоспалительное, болеутоляющее действие, изменение окислительно-восстановительных и ферментативных процессов в простате, бактериостатический эффект, повышение эффективности антибактериальной терапии и другие [184].

### *1.3.5 Стандартная консервативная терапия*

В настоящее время стандартная консервативная терапия мужской инфертильности испытывает некоторые сложности, связанные с тем, что большинство имеющихся на фармацевтическом рынке лекарственных препаратов и биологических активных добавок (БАД), на которые возлагались большие надежды, себя не оправдали. Возможности использования этих средств серьезно ограничивает и список заболеваний, сопровождающихся нарушениями сперматогенеза, при которых их можно использовать.

Применение медикаментозной терапии возможно лишь при инфертильности, обусловленной эндокринными причинами (заболевания щитовидной железы, гипогонадотропный гипогонадизм, пролактиномы), при бесплодии, обусловленном аномалиями репродуктивных органов (крипторхизм, ретроградная эякуляция), при инфертильности на фоне наличия инфекций и ряда воспалительных заболеваний органов репродуктивной системы, таких как хронический простатит, орхит, везикулит, эпидидимит и т.д.) [165]. Терапия лекарственными средствами также возможна при бесплодии, обусловленном иммунным фактором, при нарушениях сперматогенеза на фоне, сопутствующих заболеваний (бронхиальная астма, эмфизема легких, ХПН, гепатиты, цирроз печени, гипертоническая болезнь и т.д.), а также при бесплодии, обусловленном использованием фармакологических средств, применяющихся в лечении других заболеваний [36]. Использование консервативной терапии во всех остальных случаях, в настоящее время, не оправдано, и может наносить дополнительный вред пациентам, за счет потерь времени, ограничивающего репродуктивный возраст, значительные финансы и надежду в будущем получить беременность.

#### *1.3.5.1 Эндокринное бесплодие*

На долю эндокринологического бесплодия, по данным литературы, среди всех клинических форм инфертильности приходится около 8,9% [156]. Эффективное лечение возможно лишь при заболеваниях, сопровождающихся гипогонадотропным гипогонадизмом. В остальных случаях, при наличии синдрома Клайнфельтера, при синдроме одних клеток Сертоли, при любой генетически обусловленной блокаде сперматогенеза (трисомия, аутомсомные аномалии, делеции Y-хромосомы), при дефектах опущения яичек и системных заболеваниях помочь могут только вспомогательные репродуктивные технологии (ЭКО-ИКСИ) [150].

#### 1.3.5.1.1 Гипогонадотропный гипогонадизм, синдром Каллмана, гипофизарный нанизм

В лечении infertility при наличии данных заболеваний применяется хорионический гонадотропин (по 1500-2000 ЕД внутримышечно 2-3 раза в неделю по 3-4 месяца, с перерывами) с положительным эффектом. Интересно, что при этом иногда требуется дополнительная стимуляция андрогенами, оказывающими контрацептивный эффект. Например, лечение ХГЧ в дозе 1500 ЕД внутримышечно через день в течение 12-24 месяцев, отмечало положительный эффект в отношении формирования единичных сперматогоний при биопсии у больных с азооспермией, в то время, как использование пропионата тестостерона и порознь, и в сочетании с МПГ не давало лечебного эффекта [162]. Для лечения кодированного ЛГ или ФСГ полезно сочетание ХГЧ и МПГ [58]. Импульсное введение препаратов ГнРГ (Лютрелэф и др.) подкожно с помощью инфузомата, в дозе 5-20 мкг/импульс каждые 120 минут усиливает синтез гонадотропинов гипофизом, стимулируют продукцию половых стероидов и созревание сперматозоидов в яичках. Данный вариант лечения может быть использован пока в сперме не появятся сперматозоиды либо не наступит беременность [59]. Лечение может быть длительным, потому, что вероятность восстановления фертильности, например, при синдроме Кальмана, перспективна и приближается к 100% [59]. Данный вариант терапии возможен при крипторхизме, а также при малом объеме яичек, так как у всех пациентов размеры половых органов, оволосение и объем яичек при таком лечении может значительно возрастать [22]. В результате у таких пациентов возможно появление вторичных половых признаков и даже достижение показателя фертильности [24].

#### 1.3.5.1.2 Пролактинома

В настоящее время лечение infertility, обусловленной наличием пролактиномы связано с лечением основного заболевания. Для лечения используются агонисты дофамина – бромокриптин, каберголин, абергин, норпролак, достинекс и т.д., при неэффективности которого применяется хирургическое лечение, в виде ревизии турецкого седла, лучевая терапия или одновременное использование обоих вариантов лечения. При этом нормализуется уровень пролактина (ПРЛ), а также появляется возможность контролировать размеры аденомы с помощью МРТ. Такая тактика достаточно часто позволяет избежать нейрохирургического вмешательства или лучевой терапии.



Прием агонистов дофамина позволяет восстанавливать нормальный уровень пролактина и восстановить функцию системы гипоталамус–гипофиз–гонады у больных с идиопатической формой гиперпролактинемии, а также с наличием микропролактином в 80-85% случаев. При макропролактиномах на фоне терапии каберголином уровень пролактина у 60% пациентов снижается до нормальных уровней, а герминогенная функция яичек восстанавливается более чем у 50% пациентов [58, 63].

#### 1.3.5.1.3 Повышенное содержание эстрогенов

Антиэстрогенные препараты, применяющиеся при лечении гипогонадотропного гипогонадизма, такие как, например, кломифен цитрат и тамоксифен, блокируют цитоплазматические рецепторы эстрогена в гипоталамусе, создавая таким образом искусственный дефицит эстрогенов и активируя секрецию гонадотропных гормонов по принципу обратной связи. Рекомендованные дозы по данной схеме, составляют 25-50 мг/сутки или 100 мг через день [126, 148].

По данным руководства E. Nieschlag, H. Behre (2010) при этом происходит повышение подвижности сперматозоидов и увеличение их концентрации, причем подвижность растет быстрее, чем концентрация, но не приводит к достоверному увеличению количества беременностей. Антиэстрогенный эффект тамоксифена, менее заметный по сравнению с кломифеном цитратом, но также эффективно способен увеличить секрецию собственных гонадотропинов. В литературе единого мнения [172] по поводу назначения антиэстрогенов нет, так как в большинстве рандомизированных исследований, где наблюдались признаки активации сперматогенеза, такое лечение не приводило к увеличению частоты наступления беременностей, поэтому применение этой группы препаратов до сих пор является предметом дискуссии [94, 189].

У мужчин с гипогонадизмом, при условии повышенного уровня эстрадиола и гипотестостеронемии показано использование препаратов, которые относятся к группе ингибиторов ароматазы, например анастрозол 1 мг ежедневно или тестолактон 50-100 мг 2 раза в день не менее 2-3 месяцев [118, 119].

### ***1.3.6 Консервативная терапия бесплодия, обусловленного органическими факторами***

Органические причин, приводящие к бесплодию, и в первую очередь различные аномалии (крипторхизм, атрезии протоков, тазовые экстрофии и т.д.) занимают около 7,8% среди всех клинических форм infertility [71]. Большинство аномалий устраняются хирургическим способом, но, в течение 1 года жизни детям с выявленным крипторхизмом требуется стимулирующая терапия гонадотропинами или пациентам с наличием дисфункции внутреннего сфинктера, когда эякулят эвакуируется в полость мочевого пузыря, показано назначение консервативной терапии.

#### ***1.3.6.1 Медикаментозное лечение крипторхизма***

Крипторхизм – полиэтиологическое заболевание, самым выраженным симптомом которого является неполное опущение или полная онтогенетическая миграция яичек в мошонку. В настоящее время, более чем двадцатилетний опыт стимулирующего действия гормонов показал, что медикаментозное лечение крипторхизма, даже в первые годы жизни, недостаточно успешно [22]. С целью гормонотерапии в настоящее время применяется хорионический гонадотропин (хориогонин, прегнил детям в возрасте до 10 лет по стандартной схеме – 500-1000 ЕД, или для детей более старшего возраста свыше 10 лет – по 1500 ЕД 2-3 раза в неделю. При клинически значимом стимулирующем ответе гонад, через 3 месяца курс лечения повторяют. В EAU Guidelines (2013-2017) сообщается о том, что терапия ХГЧ у детей с крипторхизмом в возрасте более 1 года малоэффективна [71]. Гормональную терапию в качестве способа консервативного принудительного низведения яичек назначают больным крипторхизмом в первые годы жизни. При этом отмечается, что 2-3 курсами стимулирующей терапии удастся добиться самостоятельного опускания яичек в мошонку не более чем в 15% случаев. У больных с приобретенным крипторхизмом гормонотерапия противопоказана [58].

#### ***1.3.6.2 Лечение ретроградной эякуляции***

Ретроградная эякуляция – является симптомом отсутствия спермы при оргазме, которое происходит из-за дисфункции внутреннего сфинктера. При этом внутренний сфинктер и шейка

мочевого пузыря не закрывается полностью и, при семяизвержении, сперма забрасывается ретроградно в мочевой пузырь. При генерализованном спазме мышц тазового дна выделение спермы антеградно из наружного отверстия мочеиспускательного канала не происходит, но при мочеиспускании ее следы заметны в моче, или сперматозоиды могут быть выявлены в посткоитальной моче. На сексуальное удовлетворение при половой жизни этот вид нарушений эякуляции не влияет. Подобная проблема бывает вследствие перенесенных хирургических вмешательств в области шейки мочевого пузыря (ТУР простаты), на фоне приема альфа-адреноблокаторов (Омник, Кардура и др.), при неврологических заболеваниях в пояснично-крестцовом отделе, геморрое, сахарном диабете, при пороках развития (Spina bifida), варикозно расширенных венах, при тазовой конгестии и других заболеваниях [186].

Лечение ретроградной эякуляции представляет собой достаточно длительный и непростой путь для пациента, при котором максимально компенсируются причины заболевания, широко используются физиотерапии, рефлексотерапии, иглорефлексотерапия. При ретроградной эякуляции рекомендована медикаментозная терапия, цель которой – восстановление антеградной эякуляции. При этом могут быть использованы антидепрессанты с антихолинергической активностью, такие как Мидодрин (Гутрон) 5 мг 3 раза в день, Десипрамин, 50 мг каждый второй день, Имипрамин, 25-75 мг 3 раза в день, Бромфенрамина малеат, 8 мг 2 раза в день. При отсутствии эффекта пациентам рекомендуют ЭКО [85].

Встречаются работы, в которых сообщается об использовании нетрадиционных методов терапии (иглокальвание, акупунктура и др.), имеющих рефлексогенную или мануально-психологическую природу [53].

### ***1.3.7 Лечение бесплодия, обусловленного наличием инфекций или другими воспалительными заболеваниями***

На сегодняшний день некоторые нарушения фертильности могут вызывать множество специфических и неспецифических микроорганизмов, которые живут в урогенитальном тракте у мужчин и при определенных условиях способных манифестировать простатитом, уретритом, колликулитом и т.д. Но они достаточно редко проявляют свое повреждающее действие непосредственно на сперматозоиды и сегодня, с точки зрения доказательной медицины, этот эффект подтвержден лишь для уреоплазмы уреалитикум и хламидий [13]. Хламидии способны активировать апоптоз сперматозоидов, снижая их воспроизводство и выживаемость во внешней среде [49, 137]. Массивная диссеминация U. Urealyticum способна вызывать вторичное

бесплодие у мужчин. Прикрепляясь к головке сперматозоидов этот возбудитель способен существенно снижать их подвижность и нарушать процессы капацитации. Этиотропное лечение уреаплазм приводит к восстановлению фертильности [82].

Для остального вирусно-бактериального инфекционного спектра микроорганизмов прямое угнетающее влияние на сперматогенез не доказано. Провоцируя агрессивность неспецифических воспалительных реакций в системе урогенитального тракта эти микробы способны косвенно провоцировать окислительный стресс для сперматозоидов, путем привлечения лейкоцитов в очаг воспаления и меняя вязкость, текучесть и вызывая другие нарушения в реологии спермоплазмы. Интересно, что контаминации микоплазмы гениталиум на поверхности сперматозоидов, также приводит к утрате ими как подвижности, так и пенетрационной способности, а также за счет развития специфического уретрита или простатита [3, 155]. Воспалительный процесс, затрагивающий органы репродуктивной системы, способен нести повреждения гематотестикулярного барьера с развитием антиспермального иммунитета. При этом нарушения морфологии сперматозоидов в различных вариантах могут встречаться у 75% пациентов. Кроме того, при этом могут встречаться нарушения оплодотворяющей способности сперматозоидов, нарушения акросомальной реакции и капацитирующей функции сперматозоидов. Сами лейкоциты способны вызывать активное свечение при иммунофлюоресценции, аналогичное активным свободным радикалам. Поэтому пациент с клинической нормозооспермией, но с сопутствующим воспалением в половых органах должен быть обязательно санирован, так как его сперматологическая картина может существенно меняться на фоне воздействия свободных радикалов на фоне окислительного стресса при сопутствующем воспалении и такой пациент считается фертильным условно. Хронические воспалительные заболевания приводят, помимо лейкоспермии и повреждения гематотетстикулярного барьера, к изменениям физико-химических свойств спермоплазмы (уменьшается концентрация фруктозы, лимонной кислоты, повышается агглютинация сперматозоидов, снижается активность ферментов, отвечающих за разжижение спермы, изменяется рН) [165].

При этом, базовая терапия infertility направлена на лечение основного провоцирующего контаминанта, который вызывает тот или иной процесс. В настоящее время описано значительное количество схем лечения разных инфекций, с которыми можно ознакомиться в соответствующих руководствах.

Санация секрета простаты уменьшает выраженность лейкоспермии и агглютинации сперматозоидов, что повышает фертильность.

### 1.3.8 Иммунопривилегированные факторы репродуктивного тракта

Гематотестикулярный барьер и местная иммуносупрессия позволяют рассматривать яичко в качестве резервуара для вирусов (которые здесь могут быть защищены от противовирусных обработок), и это является еще одной важной причиной для хронизации вирусной инфекции и ЗППП. Иммуносупрессивные свойства семенной плазмы (предназначенные для предотвращения реакции против антигенов сперматозоидов в женские половые пути) могут играть решающую роль в течении венерических заболеваний и развития инфертильности у мужчин.

Интересно, что, несмотря на высокий риск передачи вируса с биологическими компонентами эякулята, сами вирусы не так часто повреждают сами сперматозоиды (таблица 1).

Таблица 1 – Вирусное инфицирование сперматозоидов [8, 147]

Вирус	Инфицирование сперматозоида	Изменение морфологии сперматозоида
AIDS	30%	Пиоспермия, тератоспермия
HTLV-I	Возможно	Не выявлено
HHV-8 (S.Caposi)	12%	Не доказано
CMV	5,6%	Гематоспермия, привычное невынашивание
Epstein-Barr	Не доказано	Не выявлено
ВПЧ	8%	Астенозооспермия
Hepatitis	HbS-10%, HcV, HG	HCV был обнаружен в супернатанте сперматозоидов и сперматид
Herpesvirus and adenovirus	60%	ДНК ВПГ была обнаружена в сперматозоидах человека путем гибридизации in-situ, олигоспермия
BTV (bull)	100%	Прерывание на раннем сроке, множественные аномалии развития
Porcine parvovirus (pig)	Доказано	Не определено
Herpesvirus (gibbon)	Не доказано	Тератоспермия

Как видно из представленной таблицы вероятность инфицирования сперматозоидов вирусом ВИЧ, ВПЧ, ЦМВ и другими, незначительна, но риск инфицирования дружественного

организма компонентами эякулята очень высокий. Поэтому бактерии, такие как хламидии и уреоплазмы должны быть санированы, а при возникновении астенозооспермии на фоне течения, например, герпесвирусной инфекции, ее активность можно ослабить с помощью специфической иммуномодулирующей и противовирусной терапии, которая потребна на протяжении 1 фазы менструального цикла [3, 8, 18, 37, 78, 147, 178].

#### *1.3.8.1 Лечение бесплодия, обусловленное иммунологическими факторами*

Лечение иммунологической формы infertility семейных пар является одним из динамично развивающихся направлений, в рамках решения проблемы мужской infertility. В его основе лежат иммунологические антиспермальные реакции, которые вызывает мужскую infertility путем непосредственного повреждающего действия антител на сперматозоиды или их функции, а также вызывать дополнительные транспортные проблемы при инвазии сперматозоидов через цервикальную слизь. При этом иммунные реакции способны усиливать повреждения сперматогенеза [128]. Встречается у 5% пар, имеющих проблемы с зачатием, а антиспермальные антитела (АСАТ) выявляются у них в секрете цервикального канала, спермоплазме, а также в сыворотке крови. Обнаружение АСАТ с помощью диагностических методов (MAR-тест, IBT-тест, ИФА/ELISA и др.) позволяет выявить наличие аутоиммунных реакций против сперматозоидов пациента. Если антиспермальными антителами (АСАТ) покрыты более 40% подвижных сперматозоидов, устанавливается «мужской иммунный фактор infertility». Основной причиной является повреждение при травме или при воспалительном процессе органов репродуктивной системы [128].

Учитывая то, что женский организм способен, при отсутствии поступления антител утилизировать АСАТ в течение 3-6 месяцев. Лечение супружеских пар с выявленным повышением уровня АСАТ начинается обычно с использования барьерного метода (презерватив) в постоянном режиме сроком на 3-6 месяцев, за исключением дней овуляции, при которых сохраняются шансы наступления беременности и, поэтому, терять подходящие овуляторные периоды нецелесообразно. Дополнительно может назначаться терапия, снижающая вязкость слизи шейки матки (Флогензим, гуайфенезин, вобензим и т.д.), снижающая активность образования антиспермальных антител. При отсутствии клинического эффекта на фоне консервативной терапии, ситуацию с получением беременности можно решить с помощью ВРТ, в виде внутриматочной инсеминации обработанными сперматозоидами мужа (ИИСМ) или ЭКО (ИКСИ).

Для решения проблемы антиспермальных антител (АСАТ) может быть использована терапия кортикостероидами [2, 89]. Преднизолон в дозе 40 мг/сут курсами до 3-5 дней способен снижать агрессивность синтеза антиспермальных антител. Тем не менее, данный вариант терапии сегодня считается малоэффективным, так как у него имеется достаточное количество сопутствующих иммунологических побочных реакций (гиперкортицизм, синдром Кушинга и.т.д.), возникающих при длительном приеме. Метод способен ослабить синтез антител, но не прекратить его полностью, поэтому через некоторое время вновь следует ожидать ухудшения. Дополнительно может быть использован плазмаферез, для удаления из крови пациента циркулирующих иммунных комплексов АСАТ до отрицательных значений, что в 89% случаев приводит к улучшению спермограммы и повышает частоту появления беременностей.

Встречаются сообщения об использовании гипербарической оксигенации (ГБО) у пациентов с АСАТ, которая демонстрирует эффективность этого метода вспомогательного лечения у больных с олигозооспермией. Снижение активности окислительного стресса является важным фактором уменьшения активности синтеза АСАТ. По данным В.А. Божедомова и М.А. Торопцевой [2] у пациентов с нормоспермией и гиперпродукцией активных форм кислорода (АФК) в 52,9% имелись нарушения акросомальной реакции. У 52,2% на фоне высоких АФК выявлен высокий уровень АСАТ. У пациентов с ХБП – высокий уровень АФК выявлен в 64,1%, а у пациентов с варикоцеле уровень АФК в спермоплазме выше в 1,9 раз. Поэтому назначение различных антиоксидантов имеет патогенетическое обоснование применения при иммунном факторе infertility.

Интересны работы, посвященные использованию антиоксиданта Эмоксипина при иммунном факторе. Помимо антиоксидантного действия препарат обладает антитоксическим и мембраностабилизирующим действием, поэтому часто используется в офтальмологии, как средство, способствующее снижению активности стрессовых реакций при травмах сетчатки глаза. Назначение раствора Эмоксипина в дозе 0,3-0,5 мл в/м мужчине начиная с 1 дня месячных и до дня овуляции у партнерши, приводит к статистически достоверному снижению уровня АСАТ. Причем для эффективного снижения уровня АСАТ необходимо не менее двух подобных курсов [2].

Отдельно следует рассматривать клинические эффекты убихинона (коэнзима Q10). Убихинон участвует в обеспечении энергетических в митохондриях и поэтому необходим сперматозоидам, чьи энергетические затраты в период движения чрезвычайно велики. Кроме того, он выполняет важные метаболические и антиокислительные функции, способствует увеличению общего количества сперматозоидов, их подвижности, уменьшению доли тератозооспермии. Уровень коэнзима Q10 коррелирует с маркерами окислительного стресса

сперматозоидов, снижая активность перекисного окисления липидов клеточных мембран, в частности, при повреждении ДНК [80].

Несмотря на некоторую неоднозначность полученных результатов, ввиду отсутствия эффективных методик по снижению АСАТ, описанные выше методы заслуживают самого пристального внимания.

### ***1.3.9 Лечение инфертильности, на фоне экстрагенитальных заболеваний и методов их лечения***

Существует большое количество заболеваний (бронхиальная астма, хроническая почечная недостаточность, гепатиты, гипертоническая болезнь, цирроз печени, эмфизема легких, и другие), которые протекают с выраженной интоксикацией на фоне значительного оксидативного стресса, поэтому компенсация повреждений процессов сперматогенеза заключается в их эффективном лечении, с учетом и оценкой негативного действия лекарств и тщательного подбора специфической терапии. К лекарственным препаратам, негативно влияющих на сперматогенез, относятся препараты следующих групп: Противоопухолевые препараты, Цитостатики и противоопухолевые антибиотики, Андрогены, Глюкокортикоиды в дозах, значительно превышающих физиологические, Препараты тиреоидных гормонов в дозах, значительно превышающих физиологические, Противозлептические средства, Агонисты и антагонисты гонадотропинрилизинг гормона, Нейролептики, Антидепрессанты, Анаболические стероиды, Антагонисты дофамина, Снотворные препараты, Эстрогены, Антагонисты H<sub>2</sub>-рецепторов, Антиандрогенные препараты, Ингибиторы 5 альфа – редуктазы, Альфа и бета – адреноблокаторы, Наркотические средства, Блокаторы стероидогенеза, Противотуберкулезные препараты, Гиполипидемические препараты, и другие средства [67].

Следует уделить особое внимание использованию антибактериальных препаратов, так как многие из антибактериальных групп способны оказывать токсическое воздействие на сперматогенез, особенно макролиды, тетрациклины, нитрофураны (фурадонин, фурагин). Все они угнетают сперматогенез, провоцируют астенизацию сперматозоидов [175]. При выборе антибиотиков, следует использовать цефалоспорины, в меньшей степени фторхинолоны [31, 70, 149].

Кортикостероиды, такие как, гидрокортизон, синестрол, преднизолон, дексаметазон, и противогрибковые препараты (кетоконазол) резко угнетают герминогенную функцию яичек, отрицательно влияя на первичные генерации сперматогенеза [79, 88, 142].



Интересно, что в качестве маркера выраженности токсичности проводимой терапии предлагается использование антимюллерова гормона (АМГ). В частности, концентрация АМГ в сыворотке крови коррелирует с повышенным ФСГ, концентрацией Тестостерона, а также со снижением концентрации ингибина-В у пациентов, проходящих по гонадотоксическим протоколам (терапия цисплатином или бусульфаном) и остается неизменной в «негонадотоксичных» протоколах (капцитабин). Концентрации АМГ в сыворотке крови и ткани яичка были практически одинаковы, при этом была выявлена отрицательная корреляция с изменениями весовых характеристик придатков и яичек, а также с подвижностью сперматозоидов. Увеличение тестикулярной экспрессии АМГ также коррелирует с повышенным уровнем апоптоза (terminal transferase-mediated deoxyuridine 5-triphosphate nick-end labeling) и пониженной пролиферации (Ki67, ядерный антиген пролиферирующих клеток). Исследование показывает, что характер экспрессии АМГ в сыворотке крови, в сочетании с другими гормонами, могут разграничить степень и выраженность тестикулярных повреждений [34].

### ***1.3.10 Нарушения кристаллообразующей функции спермоплазмы и их лечение***

Для лечения нарушений кристаллообразующей функции спермоплазмы используются энзимные препараты, которая встречается достаточно часто, например, при муковисцидозе или при хроническом простатите, которые могут манифестировать появлением агглютинации и агрегации сперматозоидов. Подобная ситуация наблюдается и при наличии антиспермальных антител (АСАТ). Патогенетически терапия оправдана, но эффективность не превышает 60%. Схемы назначения энзимов существенно различаются и ограничиваются в первую очередь высокой стоимостью терапии, а также то, что данный вариант лечения является симптоматическим, и нарушения кристаллообразующей функции спермоплазмы могут вернуться с высокой долей вероятности после отмены курсового лечения. С учетом фармакокинетики препаратов, более целесообразно использовать данную группу препаратов в увеличенных дозах, например, за 4-5 дней до овуляции у партнерши. Для длительных курсов используются стандартные дозы Вобэнзима, например, первые 2 недели назначался по 5 драже 3 раза в день, остальные 6 недель по 2 драже 3 раза в день, Флогэнзим – по 3 драже 3 раза в день 2 недели, затем по 2 драже 3 раза в день. Длительные курсы ввиду крупных габаритов таблеток и большими дозами – 3-5 таблеток 3-4 раза в день крайне неудобны для пациентов, хотя эти таблетки можно дробить при приеме [61].

### ***1.3.11 Неспецифические модуляторы***

Примером таких модуляторов может являться рибоксин, который также может быть назначен при различных вариантах сперматологических нарушений. Препарат к группе неспецифических средств, которые способны улучшить метаболизм и энергообеспечение при синтезе сперматозоидов, с одновременным уменьшением энергетической потребности и уменьшения гипоксии сперматогенного эпителия. В составе Рибоксина имеется Инозин (200 мг), оказывающий эффект аналогичный предшественникам АТФ, который способен оказывать анаболическое действие, повышать активность ряда ферментов цикла Кребса, и обеспечивать внутриклеточный транспорт энергии. Рибоксин оказывает антигипоксическое и метаболическое действие, активирует регенерацию тканей в том числе сперматозоидов. В эксперименте и клинических испытаниях [3, 108] было показано, что на фоне терапии Рибоксином на животной модели было выявлено увеличение диаметра извитых семенных канальцев на фоне увеличения сперматогенных клеток, а также снижения активности слушивания их в просвет семенных канальцев. Кроме того, за счет уменьшения гипоксии тканей и улучшения трофики в фокусах концентрации клеток Лейдига было отмечено повышение уровня сывороточного тестостерона и соотношения тестостерон/эстрадиол. При этом в результате чего увеличивается концентрация и подвижность сперматозоидов. Назначается Рибоксин курсами не менее 1 месяца в дозировке 1-2 таблетки 3 р/день.

### ***1.3.12 Комбинированные витаминно-минеральные комплексы***

Из имеющихся на фармацевтическом рынке экзогенных витаминов некоторый положительный эффект был подтвержден для фолиевой кислоты, витаминов Е и С, L- карнитина, цинка, селена и L-аргинина. Большинство этих микроэлементов и витаминов содержатся в составах мультивитаминных и ферментных комплексов, таких как Спеман, Профертил, Спермактин, Андродоз и т.д., обладают некоторой эффективностью и преимуществами по сравнению аналогичными мультивитаминными комплексами, содержащими подобный набор микроэлементов, но клинический эффект у них часто недостаточен.

Использование консервативной терапии имеет некоторые ограничения по времени (рисунок 2). Если супружеские пара не имеет беременности в течение 1 года при хорошей динамике по лечению симптомов нарушения сперматогенеза, то не в зависимости от количества проведенных курсов, она должна быть проконсультирована в клинике

вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Ориентировочная тактика и длительность курсов лечения, в зависимости от клинических исходов представлена на схеме, составленной в соавторстве с Е.А. Ефремовым (2008) [16].

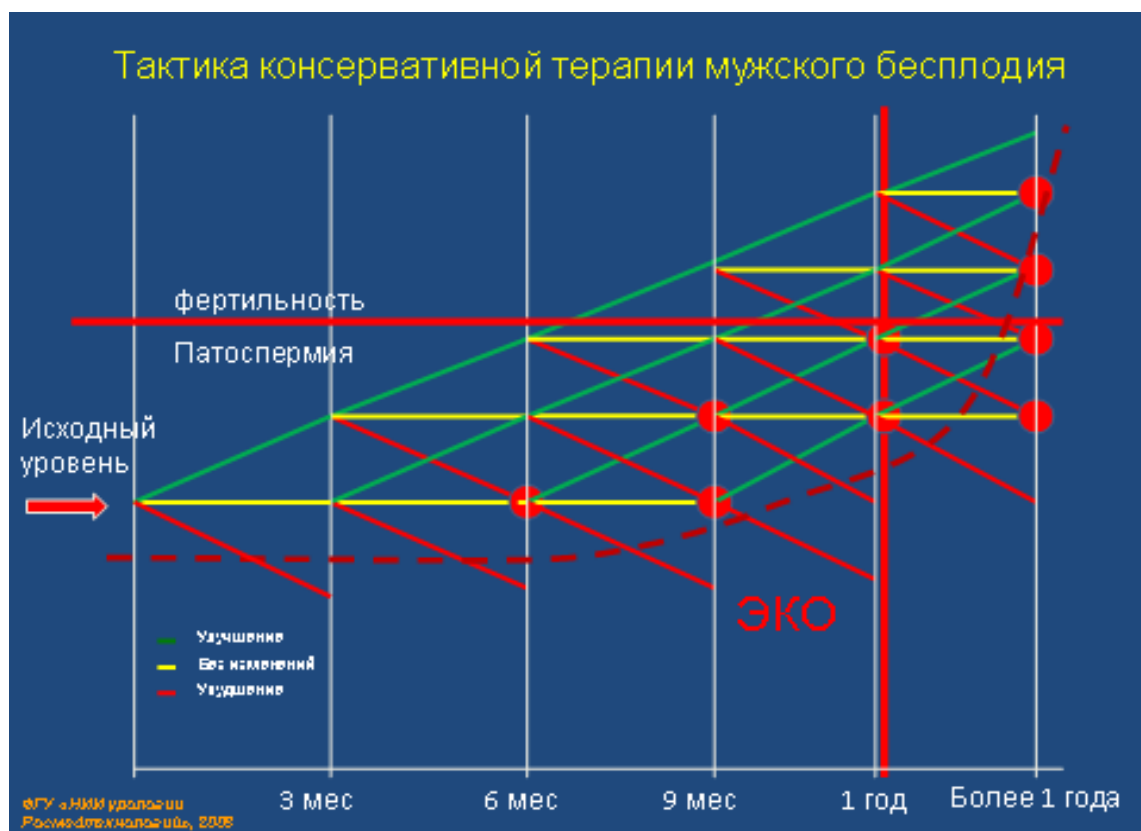


Рисунок 2 – Тактика консервативной терапии мужского бесплодия

Стандартные циклы курсовой терапии назначаются на 2-3 месяца, с учетом времени развития сперматозоида – 72 дня. При отсутствии улучшения терапия может быть изменена. Если смена лекарственных средств не приводит к улучшению, то дальнейшее назначение средств приведет только к лишним потерям времени и финансов, и поэтому не имеет смысла. Все случаи ухудшения спермограммы являются прямым показанием для консультации специалистами в клиниках, использующих вспомогательные репродуктивные технологии (ЭКО-ИКСИ).

### 1.3.13 Реконструктивные репродуктивные операции

После реконструктивных операций на семявыносящих путях их проходимость восстанавливается в 60-87%, беременность наступает в 10-43% случаев [42, 55]. Результаты

лечения могут ухудшаться при выраженных морфологических изменениях ткани яичка, отсутствии спермы в семенной жидкости, полученной из извитых семенных канальцев, или распространенном фиброзе придатка.

При ликвидации последствий вазорезекции, выполненной с целью контрацепции, вазоэпидидимостомия оказалась более эффективной с медицинской и экономической точки зрения по сравнению с MESA и ИКСИ. При ранней вазовазостомии, предпринятой для восстановления фертильности после вазорезекции, в 90% удается обеспечить проходимость семявыносящих путей [48]. Частота наступления беременности при этом ниже и зависит от сроков, прошедших после вазорезекции. При реконструктивной операции через 3 года после вазэктомии частота восстановления проходимости семявыносящего протока и наступления беременности равна 97 и 76% соответственно, через 3-8 лет – 88 и 53%, через 9-14 лет – 79 и 44%, через 15 лет и более – 71 и 30% соответственно [70].

При этом следует помнить о высоком риске (до 35%) возникновения аутоиммунного фактора infertility, возникающего при повреждении гемато-тестикулярного барьера. Поэтому материалы диагностической биопсии яичка, которая проводится перед формированием анастомоза, в случае выявления активных сперматозоидов, должны быть использованы в программе ВРТ или помещены на криосохранение [38].

## **1.4 Вспомогательные репродуктивные технологии – мужской фактор**

### ***1.4.1 Внутриматочная инсеминация***

Процедура внутриматочной инсеминации (ВМИ, ИИСМ) известна достаточно давно и широко используется в центрах репродуктивных технологий. При выполнении ВМИ подготовленная подогретая сперма в концентрированном или разведенном виде (профузия) по катетеру вводится в полость матки женщины в период овуляции, чтобы сперматозоиды оказались ближе к яйцеклетке минуя фильтрационный иммунный барьер цервикального канала. По своей сути, это попытка количеством решить проблему качества мужского биоматериала [33]. Эта процедура часто сопровождается приемом препаратов, стимулирующих овуляцию. Процедура достаточно эффективная и по статистике 3-4 инсеминации равны по эффективности 1 процедуре ЭКО (ICSI) [39, 107, 121, 179]. ИИСМ имеет возрастные ограничения и пациентам старше 37-42 лет, вследствие высокого риска получения оплодотворения дефектным сперматозоидом, такой материал лучше не использовать [2, 66].

### *1.4.2 Экстракорпоральное оплодотворение*

В 1990 году на нашей планете насчитывалось свыше 20 тыс. детей, зачатых в пробирке. В 2010 году – около 4 миллионов [39]. В основе метода лежит транспортировка генетического материала сперматозоида в яйцеклетку в искусственных условиях. Полученную при эякуляции сперму, или сперматозоиды, полученные хирургическими методами: аспирация содержимого эпидидимиса, биопсия яичка (RETE, TESA, MESA, TESE, PESA, SPAS и другие) отмывают от семенной жидкости и выделяют наиболее качественные из них с помощью специальных методов. У женщин производится пункция или биопсия яичника, с целью забора яйцеклеток. Затем, наилучшие с точки зрения морфологии сперматозоиды и яйцеклетки могут быть использованы для процедуры ИКСИ. Для повышения вероятности успешной имплантации одновременно трансплантируют сразу несколько эмбрионов. Эффективность лечения бесплодия методом ЭКО невысока: приблизительно одна из трех пациенток становится беременной после процедуры ЭКО, приблизительно одна из четырех пациенток завершает лечение рождением ребёнка [54, 135]. Тем не менее, качественный состав используемых при ВРТ сперматозоидов имеет главнейшее значение и полностью определяет возможность развития каждого эмбриона на сроке до 6 недель включительно [76].

Несмотря на то, что на текущем этапе развития метод ЭКО дал возможность реализовать функцию деторождения очень многим счастливым парам, данный метод не является идеальным и, несмотря на то, что он является безальтернативным при многих вариантах мужской infertility, которые ранее считались абсолютно бесперспективными для лечения, его сравнительная эффективность остается сравнительно невысокой. Эффективность 1 попытки ВРТ (ЭКО-ИКСИ) колеблется от 25 до 35% [66]. Кроме того, использование репродуктивных технологий и их успехи воспринимаются общественностью и самими исследователями весьма неоднозначно, так как у медицинских и парамедицинских специалистов возникают морально-этические вопросы, касающиеся, например, статуса эмбриона человека, возраста, с которого он рассматривается как личность, защищаемая законодательством, правомочность манипуляций на половых клетках и эмбрионах пациентов как с медицинскими, так и исследовательскими целями, и т.д. Множество вопросов касаются правомочности замораживания эмбрионов человека, криохранения ооцитов и сперматозоидов и использования их для реципиентов и т.д. В России для большинства из этих аспектов нормативные документы отсутствуют, кроме того отсутствуют законодательные акты в отношении большинства из перечисленных вопросов.

## **1.5 Перспективные направления для лечения infertility у мужчин**

### ***1.5.1 Механизмы иммунопривилегированности мужских и женских половых клеток и органов репродуктивного тракта***

Эякулят является вектором размножения вирусов: в настоящее время четко доказан факт передачи вирусов с эякулятом. Иммунный ответ микросреды женских половых органов к инфекционным агентам, присутствующих в составе иммунных факторов женского полового тракта, зависит и может нивелироваться, высоким уровнем иммуносупрессивных агентов, присутствующих в семенной плазме. По всей видимости здесь присутствует специфическая система сигналов распознавания чужеродных агрессивных факторов, по типу «свой-чужой», поэтому 90% всей инфекций репродуктивного тракта течет бессимптомно. Поскольку инфекционный или вирусный агент попал в половые пути с продуктами эякулята, иммунный ответ на которые заблокирован, то эти агенты, также, как и сперматозоиды, могут рассматриваться как «условно дружелюбные» и иммунный ответ на чужеродный фактор будет минимальным.

Поэтому выяснение противовирусных систем защиты репродуктивного тракта и исследование того, почему эти системы носят разрешительный характер для целого ряда вирусов, является одним из наиболее перспективных направлений развития репродуктологии.

### ***1.5.2 Генетически обусловленная infertility и методы ее коррекции***

Новое динамично развивающееся направление. Имеет большое клиническое значение, так как у 5-20% от всех пациентов с нарушением сперматогенеза обнаруживаются хромосомные аномалии, в первую очередь половых хромосом. При азооспермии аномалии хромосом выявляют в 20% случаев, а при олигозооспермии – около 7% случаев. В 10-15% случаев идиопатической азооспермии и 5-10% случаев олигозооспермии тяжелой степени у мужчин обнаруживают микроделеции в локусе AZF (хромосома Y) [138], причем сперматозоиды могут быть получены при microTESE только в варианте AZFc. С созданием обширных генных библиотек, синтезом новых медиаторов, возможностей технологий генной инженерии, это направление еще очень долго будет актуальным и перспективным.

### ***1.5.3 Механизмы апоптоза сперматозоидов***

Известно, запрограммированная гибель клеток (апоптоз) сопровождает нормальный сперматогенез, в результате устраняются поврежденные или некомпетентные с точки зрения развития гамет, но значительный уровень апоптоза коррелирует с арестом сперматогенеза (пахитена мейоза I и стадия круглых сперматид – контрольные точки сперматогенеза). Это направление также является перспективным и клинически значимым и будет представлять интерес медицинской общественности еще долгие годы. Интересно что, например, хламидии способны вызывать преждевременный (внеплановый) апоптоз сперматозоидов [106]. Поэтому изучение механизмов апоптоза сперматозоидов – важное направление развития современной науки.

### ***1.5.4 Трансплантация донорских клеток Сертоли***

В работах коллектива авторов, под руководством академика РАН Н.Д. Озернюка с соавторами сообщалось о возможности трансплантации клеток Сертоли (биоинкубаторов сперматогенеза) в канальцы, где отсутствовали не только форменные элементы, но и клетки Сертоли. После трансплантации донорских клеток Сертоли было выявлено появление в канальцах элементов сперматогенеза [10].

### ***1.5.5 Экспериментальная регуляция пола у животных***

Методы термического партеногенеза и андрогенеза, разработанные на тутовом шелкопряде, дают возможность получать особей любого пола и сохранять редкие виды насекомых. Метод искусственного термического партеногенеза позволяет получать в потомстве только самок, а метод экспериментального андрогенеза дает возможность получать в потомстве только самцов. В перспективе эту технологию можно усовершенствовать для клинического использования [10].

***1.5.6 Возможности терапии инфертильности культурами,  
обогащенными стволовыми / прогениторными клетками,  
на основе изучения современных аспектов клеточного развития и их функций***

Терапия культурами, обогащенными стволовыми / прогениторными клетками, при мужской инфертильности у мужчин, является новым направлением, которое, имеет огромный потенциал роста и развития, и динамично развивается во всем мире. На территории Российской Федерации официально зарегистрировано более 40 клеточных технологий, которые нашли применение в различных областях клинической медицины, например, в онкогематологии, геронтологии, косметологии и других.

Данные технологии и успехи их применения, о которых периодически сообщается в мировой печати, заслуживают пристального внимания и могут рассматриваться в качестве перспективных методов для лечения мужского бесплодия. Разбираемые в данном обзоре попытки восстановления фертильности у мужчин с помощью культур, обогащенных различными видами стволовых клеток (сингенных, аутологичных и т.д.) часто являются неоднозначными и служат предметом дальнейшего изучения.

В настоящее время в мировой печати опубликовано значительное количество печатных работ, посвященных расшифровке основных механизмов, обеспечивающих жизнедеятельность и функционирование клеточных культур, которые могут быть использованы для лечения нарушений сперматогенеза. Многие фундаментальные закономерности процессов развития и дифференцировки, выделения и культивирования сперматогенных стволовых/прогениторных клеток серьезно изучены, но исследовательская активность по данному направлению продолжает оставаться очень высокой. Восстановление сперматогенеза у бесплодных пар является одной из важнейших задач, стоящих перед современной медициной, и имеет большое социальное и медико-биологическое значение. В связи с постепенным и прогрессивным ухудшением качественного состава спермы данное направление особенно актуально. Регенеративная медицина обогащенными клеточными культурами будет способствовать дальнейшему развитию методов искусственного оплодотворения, криоконсервации, и сохранения редких и исчезающих видов животных.

Эффективность восстановления сперматогенеза, при терапии культурами, обогащенными сперматогенными стволовыми и прогениторными клетками у животных, в различных вариантах по разным данным, колеблется от 18 до 80% [46, 64, 69].

Исторически сложилось так, что яичко было первым органом, подвергшимся экспериментальной трансплантации. Hunter, пересаживая яички каплунам в 1767 году,



описывал происходящие изменения после этой манипуляции, а Gobell в 1898 году впервые произвел пересадку яичек у млекопитающих [5].

Впервые термин «стволовая клетка» был предложен русским гистологом профессором Военно-медицинской Академии Александром Максимовым (1874-1928). Он постулировал существование лимфоцита, как универсальной стволовой кроветворной клетки [10]. Он высказал гипотезу о существовании недифференцированных клеток, сохраняющихся в организме пожизненно, которые могли превращаться в лимфоциты и другие специализированные клетки соединительной ткани и крови. Клетки были названы по аналогии со строением дерева, то есть ветками, растущими от одного ствола.

Впервые успешная терапия культурами, обогащенными сперматогенными стволовыми клетками, были произведена Ральфом Бринстером в 1994 году [45], у на животной мышинной модели. В этих работах на культуру, содержащую стволовые /прогениторные клетки, полученные из семенников мышей, нанесли специальную метку, экспрессирующую репортерный ген *lacZ*, а затем ввели семенные каналцы мышей-реципиентов. Эта работа является отправной точкой в дальнейшем продвижении данного направления, так как у этих грызунов через некоторое время в некоторых семенных каналцах был выявлен полноценный донорский сперматогенез, полученное потомство, экспрессировало белок *lacZ*, что доказало способность донорских сперматогенных стволовых клеток запускать полный цикл сперматогенеза вплоть до зрелых, пригодных для оплодотворения форм. Начиная с 1994, за период более 25 лет накоплен колоссальный опыт в изучении биологии, физиологии и клинических особенностей применения стволовых клеток различных видов, в различных областях медицины [69, 86, 87].

Еще одним интересным направлением является исследование контролируемого деления сперматогониальных стволовых и прогенииторных клеток в условиях моделирования клеточной ниши. В настоящее время существуют две гипотезы относительно процессов самообновления и коммитации сперматогониальных стволовых клеток. Согласно первой, эти клетки делится симметрично, давая начало либо двум дочерним идентичным клеткам, либо себе подобным, либо прогенииторным, которые могут начать дальнейшую специализированную дифференцировку. Когда сперматогониальная стволовая клетка выходит на траекторию развития клеток сперматогенеза, приходящей к своей конечной точке – спермиям, освобождается клеточная ниша, которая создает условия для запуска механизма самообновления соседней сперматогониальной стволовой клетки, в результате которого одна из вновь образовавшихся клеток занимает освободившуюся нишу. Этот механизм обновления может поддерживаться целостность и устойчивость стволового компартмента сперматогенной системы на протяжении длительного времени [65]. У высших приматов и человека в сперматогенной клеточной нише невозможна реализация регуляции внешнего механизма, управляющего асимметричным делением стволовых клеток. Это происходит

потому, что при делении сперматогониальных стволовых клеток дочерние клетки не теряют контакта с базальной мембраной, не покидают пределов ниши и остаются в контакте с одной и той же клеткой Сертоли. Существуют работы, в которых сообщается о том, что запуск направленной дифференцировки в условиях клеточной ниши возможен *in vitro*, с помощью искусственно созданных биохимических внешних сигналов [25, 153].

В литературе встречаются работы посвященные трансплантации сперматогониальных стволовых клеток у животных одного вида. Отмечено, что трансплантация сперматогониальных стволовых клеток у животных одного вида, от фертильных к бесплодным животным, приводила к восстановлению сперматогенеза у реципиентов [57, 69]. В этом же обзоре опубликованы данные о попытках получения сперматогониальных клеток и дочерних клеток при различных межвидовых ксенотрансплантациях и выявлено, чем более значительно межвидовое различие, тем на более ранней стадии происходит арест сперматогенеза. Если на уровне мышь-крыса, стволовые клетки могут быть взаимозаменяемы, то на уровне высших приматов эти данные не подтверждаются, а в литературе сообщается о единичных наблюдениях по получению потомства у инфертильных высших приматов и человека [139, 145].

Впервые удачную ксенотрансплантацию человеческих стволовых и прогениторных клеток в семенники иммунодефицитных мышей удалось осуществить сразу нескольким авторским коллективам, причем пересаженные клетки сохранялись до 6 месяцев, но, к сожалению, все работы свидетельствуют об аресте сперматогенеза на начальной стадии дифференцировки сперматогониев типа Arg [87, 104, 169].

В наших работах, опубликованных ранее [14], были описаны случаи восстановления фертильности у экспериментальных животных, пролеченных на фоне хирургической коррекции искусственно созданного модельного двухстороннего крипторхизма, что также дает определенные надежды и перспективы и подтверждается данными мировой литературы [26, 40]. Тем не менее, в использовании данного метода появляются все новые вопросы. Какие клетки наиболее эффективны, какая доза клеток нужна, нет ли других альтернативных способов такому лечению. Если будут сперматозоиды, то чьи они будут? Как можно стимулировать такой сперматогенез, как использование технологий будет соответствовать вопросам безопасности и т.д.

Рынок клеточных технологий очень перспективный [115, 116]. Следует отметить, что Западная Европа и США являются лидерами мирового рынка клеточных продуктов, на котором активно конкурируют более чем 150 компаний, работающих в данной отрасли, и имеющих рыночную капитализацию более 2 триллионов долларов США [50]. Объем рынка регенераторных технологий при существующем развитии технологии и темпах роста и спроса в настоящее время оценивается примерно в 11,7 миллиардов долларов США, а к 2018 году ожидается его рост более чем в 45 раз [50, 147].

## Глава 2

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данная диссертационная работа состоит из 2 частей: клинической и экспериментальной. В клинической части приведены данные обследования 1 012 супружеских пар, проведена оценка выраженности мужского фактора бесплодия, подробно разобраны причины инфертильности. Пациентам с нарушениями спермограммы проведено 1-3 курса стимулирующего сперматогенез лечения (витамины, микроэлементы, ферменты 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. Суммарный период наблюдения за парами составил от 9 до 14 месяцев. В процессе наблюдения была выявлена группа пациентов, у которых интенсивное лечение и участие в 2 протоколах ЭКО (ИКСИ) к успеху не привело. Анализ причин неудач лечения мужской инфертильности подробно освещен в соответствующем разделе.

Для обоснования возможного применения альтернативных методов лечения в работу был включен экспериментальный раздел, который подробно освещен во 2 части работы.

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 /прогениторными клетками под белочную оболочку. Результаты экспериментального лечения изложены в соответствующих главах. Экспериментальное лечение инфертильности, обусловленной двухсторонним абдоминальным крипторхизмом в ряде случаев оказалось успешным, что может предполагать создание научного задела в перспективе имеющего клиническую апробацию метода для лечения инфертильности у мужчин. Ввиду наличия серьезных осложнений, полученных в результате проводимых экспериментов, было разработано новое направление по исследованию регенеративных возможностей секрета стволовых и прогениторных клеток в кондиционированных средах на химической доксорубициновой и цисплатиновой моделях. По решению ученого совета и локального этического комитета НМИЦ АГ и П им. В.И. Кулакова проведено исследование эффективности изучаемого метода с помощью аутологичных клеточных культур в безальтернативных клинических ситуациях у 6 пациентов.

## ***Работы 1 части: Диагностика и лечение мужской инфертильности.***

### ***Демографические данные пациентов***

На 1 этапе работы было обследовано 1 012 супружеских пар, наблюдавшихся и 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. Эти пациенты проходили предварительное обследование на кафедре и в клиниках при планировании беременности и в случае отсутствия спонтанной беременности более 1 года при условии отсутствия использования контрацептивных препаратов и методов предохранения от беременности.

### ***Обследование пар с инфертильностью***

Супружеские пары, наблюдавшиеся в медицинских центрах, обследовались по стандартным протоколам, используемым при проведении вспомогательных репродуктивных технологий у пациентов с инфертильностью. В ходе первичной диагностики собирались и оценивались данные анамнеза, сведения о перенесенных урогенитальных заболеваниях, влияющих на фертильность (гонорея, хламидиоз, микоплазмоз, уреоплазмоз и др.), изучались образ жизни пациента, выявлялись хронические заболевания, перенесенные хирургические операции, которые потенциально могли бы стать причиной невозможности зачатия естественным способом. Собирался репродуктивный анамнез у партнерш (наличие более ранних беременностей, роды, прерывания, наличие хронических заболеваний, особенности репродуктивного цикла и т.д.).

Пациентам проводился осмотр, в ходе которого оценивалась выраженность вторичных половых признаков, изучалось состояние полового члена, яичек, придатков яичек, выявлялись признаки варикоцеле, наличие артефактов в мошонке, состояние регионарных лимфатических узлов, состояние грудных желез, распределение волосяного покрова на теле, и т.д.

У мужчин проводилось исследование 1-3 спермограмм, полученных после 3-4 дневного воздержания и максимального ограничения явных провоцирующих факторов (курение, прием алкоголя, сауна и т.д.). Учитывая отсутствие универсального оснащения клинических лабораторий, в которых выполнялись анализы спермограммы, полученные данные расценивались как истинные, но морфологическая оценка проводилась в соответствии с критериями Крюгера. 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. Обследование пациентов на инфекции, передающиеся половым путем

проводилось 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 (Apoptosis sp.).

Ряду пациентов при подозрении на генетически обусловленную совместимость проводилось кариотипирование и обследование в Медико-генетическом научном центре (г. Москва).

#### ***Лечение пациентов, имеющих нарушения спермограммы***

Пациентам, у которых были выявлены нарушения спермограммы, проводились курсы лечения в течение 3 месяцев, после чего изучались контрольные исследования спермограммы, при необходимости MAR-тест и другие методы обследования. Стандартная терапия infertility у мужчин состояла из комплексных наборов, содержащих витамины, которые свободно продаются на отечественном рынке (Спеман, Сперотон, Андродоз, Спермактин, Бруди Плюс, Менс-Формула и др.), микроэлементы, антиоксиданты, ферменты и т.д.

При выявлении воспалительных изменений в эякуляте (наличие лейкоцитов и нарушение процессов агрегации и агглютинации) назначался курс противовоспалительной терапии: антибиотики тетрациклинового или цефалоспоринового ряда в комбинации с неспецифическими противовоспалительными препаратами и противогрибковой терапии в соответствии со стандартами лечения. Для коррекции выявленных нарушений агрегации и агглютинации назначались противовоспалительные средства (НПВС) и ферментные системы (Вобензим, Флогензим, Рибоксин и т.д.). При коррекции выявленного аутоиммунного фактора infertility (клинически значимый титр АСАТ) назначались антиоксиданты в больших дозах (Фолиевая кислота, Эмоксипин, комбинированная БАД Простадоз и т.д.). При выявлении нарушений гормонального фона, метаболических нарушений проводились консультации терапевта, кардиолога, эндокринолога, проводились курсы лечения в соответствии с их рекомендациями. Пациентам с варикоцеле проводилось обследование, включающее маркеры сперматогенного эпителия (ФСГ, Ингибин В и другие), объемные и сосудистые характеристики органов мошонки. При наличии показаний выполнялась варикоцелэктомия (тем или иным способом: операция по Мармару, флебосклерозирование и др.).

Тем пациентам, которым не удалось добиться возникновения спонтанной беременности в течение 6-12 месяцев, предлагались протоколы ведения ЭКО (ИКСИ).

### ***Репродуктивный протокол ЭКО – (ИКСИ)***

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», на базах следующих репродуктивных центров: «9 месяцев» (ООО «МТКлиник», Московская область, г. Жуковский, ул. Лесная, д. 1) и Многопрофильном медицинском центре «Эммаклиник» (клиника ВРТ «Дети из пробирки» г. Москва, ул. Щукинская, д. 2).

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.

### ***Работы 2 части. Этап экспериментального обоснования возможностей терапии культурами обогащенными стволовыми / прогениторными клетками при нарушениях сперматогенеза.***

#### ***Популяционная характеристика животных, которые использовались в экспериментах***

В рамках проведения работы, проводились операции на 166 белых беспородных белых крысах-самцах линии Wistar и 10 крысами линии Campbell с доказанной изначальной фертильностью, весом от 250 до 450 г, в возрасте 2,5-3 месяца, выращенных в Питомнике РАН «Крюково», в стандартных климатических условиях, на стандартных кормах. Для контроля фертильности использовалось 45 крыс-самок аналогичных характеристик. Кроме того, в работе использовались 10 мышей линии C57 Black/6 с введенным трансгеном GFP, весов 70-110 грамм, которым не проводился контроль фертильности и самки мышей не использовались.

#### ***Методология и схема исследования 2 части работы***

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. Наличие

появления потомства у всех самок свидетельствует о том, что в исследуемой экспериментальной популяции, все 100% животных были изначально фертильными.

*На 2 этапе* 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.

*На 3 этапе* 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 в тканях реципиентов после интратестикулярного введения и иммуногистохимический маркерный анализ этих культур в ксеногенном, аллогенном и аутологичном вариантах. Дополнительно был проведен цикл работ по исследованию регенеративных возможностей секрета стволовых и прогениторных клеток в кондиционированных средах на крипторхической, а также химических доксорубициновой и цисплатиновой моделях. По решению ученого совета и локального этического комитета ФГБУ НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии Минздрава РФ проведено исследование возможностей изучаемого метода в безальтернативных клинических ситуациях у 6 пациентов.

### ***Методы исследования, применяемые на 2 этапе работы***

В 1 фазу использовались следующие методы:

#### ***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 [11]. В дальнейшем оперативные вмешательства у этих животных не выполнялись. 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 [11].

Как мы писали ранее, при оценке сексуальной активности крыс на 21 сутки все крысы хорошо переносили операционный стресс, но при этом были инфертильны, за исключением животных, которые перенесли фантомные (ложные) операции [14]. Таким образом, отдаленный контрольный срок исследования фертильности был нами определен как период с 90 по 120 сутки после трансплантации, так на более ранних сроках (72 сутки) беременность возможна, но общее количество беременностей у самок незначительно [14].

*Расчет индекса фертильности:*

Для определения степени выраженности половой силы у крыс, нами дополнительно был введен **Индекс фертильности** (ИФ) для каждой из групп, который рассчитывался 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 [14]. Данный индекс оказался удобным параметром оценки половой силы у оперированных крыс.

*Метод экспериментальной хирургии:*

Для оценки результатов трансплантации различных видов стволовых клеток при трансплантации, нами была выбрана модель абдоминальной формы двухстороннего крипторхизма, описанная в диссертационной работе Е.С. Дендеберовым (1993), в модификации В.И. Кирпатовского (2008-2010) [14], заключающаяся в мобилизации яичек у животных лапаротомным доступом и фиксации их лигатурами (5/0, 6/0) в районе латеральных боковых каналов. При этом капсула яичка фиксировалась с частью паратестикулярной клетчатки при условии отсутствия натяжения тканей, чтобы обеспечить надежность фиксирующей спайки и минимизировать тканевую ишемию (рисунок 3).

После повторения аналогичной фиксации яичка, с другой стороны, операционная рана зашивалась наглухо однорядными послойными обвивными швами. При этом использовались нити толщиной 3/0-4/0. Дренажей ввиду отсутствия активного кровотечения мы не ставили. Время течения операции 20-22 минуты [14].

«Ложная» операция заключалась в мобилизации яичек в брюшную полость и последующем низведении их в мошонку. Низведение в мошонку осуществлялось после восстановления проходимости пахового канала. После рассечения сформированной спайки ножницами яичко осторожно низводилось по паховому каналу в мошонку, чтобы исключить перекручивание магистральных сосудов и после пальпации оставлялось там без фиксации (рисунок 4). Время экспозиции яичка в мошонке в группах, которые подвергались оперативной деятельности, составило 21 сутки.

При контрольных орхифуникулоэктомиях доступ осуществлялся аналогичным способом, а удаление органа производилось после наложения на основание «сосудистой ножки» синтетической не рассасываемой лигатуры Prolene (3/0), или Mersilene (3/0), с глубоким прошиванием клетчатки, во избежание соскальзывания или прорезывания лигатуры и возникновения интраоперационного артериального кровотечения.





Рисунок 3 – Формирование фиксирующей спайки

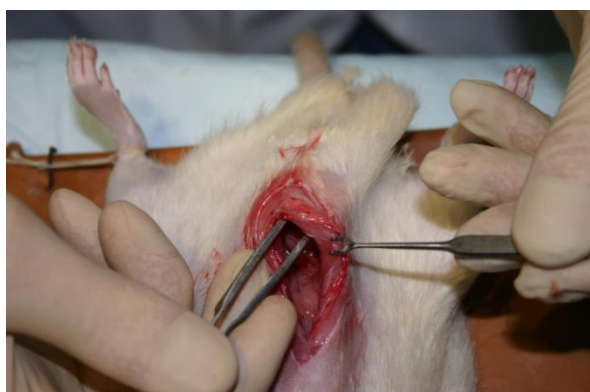


Рисунок 4 – Восстановление пахового канала

После наложения лигатуры «сосудистая ножка яичка» пересекалась, яичко удалялось на препаровочный столик, а сосудистая культя погружалась в брюшную полость, после визуального освидетельствования отсутствия кровотечения.

*Оперативная деятельность*

Результаты оперативной деятельности представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Количество экспериментальных операций на 2 этапе

№	Название операции	Количество операций
1	Формирование абдоминальной формы крипторхизма, n	168
2	Низведение яичек в мошонку, n	168
3	Орхфуникулоэктомия, n	240
5	Всего операций, n	576
4	Осложнения, n (%)	35 (9,0%)

*Анестезиологическое пособие и подготовка животных к операциям*

Для достижения обезболивающего эффекта использовался «Стабилизированный диэтиловый эфир для наркоза», производства МЕДХИМПРОМ ПХФК (Россия). Глубина наркоза оценивалась по частоте дыхания и по шевелению усов животного. При урежении частоты дыхания, возникновения его неравномерности, маска снималась для уменьшения степени наркотизации животного. При восстановлении ровного дыхания и при шевелении усов животного (возникновения обонятельной активности) маска одевалась вновь. За время операции в наркозную маску требовалось проводить добавление эфира 2 или 3 раза.

После выполнения всех операций, проведенных нами в рамках этой диссертационной работы, было отмечено 8 случаев гибели животных на столе, вследствие передозировки эфирного наркоза. Реанимационные мероприятия у этих животных успеха не имели. В случае гибели животного потеря компенсировалась из крыс резервной группы. Альтернативным методом наркотизации являлось внутрибрюшинное введение препарата Золетил (тилетамин) – анестетик диссоциативного действия или Золазепам, в комбинации с Ксилазином из расчета 20-40 мг/кг массы тела животного. Данный метод более безопасен, дает хороший обезболивающий эффект на протяжении 40 минут. Допустимо увеличение дозы в 2-3 раза.

Выведение животных из эксперимента, дальнейшее использование которых не представлялось возможным, осуществлялось путем создания углубленной медикаментозной асфиксии в наркотизаторе. Добавление дополнительных 2 мл стабилизированного эфира для наркоза, и пребывание в стеклянном наркотизаторе более 10-12 минут приводило к полному исчезновению дыхательной деятельности и гибели животных в 100% случаев. Альтернативный вариант – создание искусственного открытого двухстороннего пневмоторакса на глубине наркоза.

*Метод исследования уровня гормонов*

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) (таблица 3).

Сбор крови осуществлялся путем косоугольного купирования кончика хвоста у крысы и собирания выделяющейся крови в пластиковую пробирку, содержащую гель, объемом 4 мл. Затем полученная кровь центрифугировалась в пробирках при скорости 3000 оборотов, в течение

10 минут. Сыворотка отделялась гелем от клеток и переливалась в пробирки-эппендорфы, а затем замораживалась при минус 20 °С.

Таблица 3 – Выполненные анализы крови у крыс

№	Название анализа	Количество
1	Общий тестостерон, п	720
2	ФСГ, п	480
3	ЛГ, п	480
4	Ингибин Б, п	720
ВСЕГО:		2400

Поскольку мониторинг гормонов был важен на ранних сроках наблюдения то уровень общего тестостерона, ЛГ и ФСГ мониторировалась изначально, в момент низведения яичек в мошонку и проведения терапии обогащенными клеточными культурами.

#### *Гистология тканей после орхфуникулоэктомий*

Метод гистологических исследований основывался на микроскопической оценке состояния препаратов семенников, приготовленных по стандартной методике парафинных срезов. Фрагменты макропрепаратов или целые объекты помещались в стеклянные флаконы, объемом до 20 мл<sup>3</sup>, содержащие 10% раствор формальдегида, для последующей подготовки препаратов, по методу парафиновых блоков. 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) [14], путем подсчета сустентоцитов на 30 строго поперечных срезах семенных канальцев гистологического препарата, с помощью микроскопа «Биолан»–Р11 (ЛОМО), при общем увеличении оптической системы ×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. Расчет индекса сперматогенеза как соотношение сустентоциты/клетки сперматогенной ткани обеспечивает комплексность оценки, объективизирует исследование. Разделение нарушений

сперматогенеза на формы в зависимости от показателя индекса сперматогенеза: гипосперматогенез и атрофию сперматогенных клеток яичка увеличивает информативность исследования и повышает достоверность диагностики [14].

#### *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*

После рассечения послеоперационных рубцовых спаек в латеральных боковых каналах яичко выводилось в операционную рану и осматривалось. При нахождении на яичке участка протяженной бессосудистой зоны, производилась пункция капсулы иглой инсулинового шприца, как можно ближе к «сосудистой ножке», где визуализация крупных сосудов наиболее отчетлива, а риск их повреждения минимальный.

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 (рисунок 5) и далее, после возникновения эффекта гидропрепаровки, остальные 70% клеточной взвеси, когда игла введена параллельно капсуле на всю длину.

Введение осуществляется медленно, чтобы избежать потерь клеточной массы при вытекании клеточного препарата через перфорационное отверстие. Яичко при этом набухает и становится плотным. После окончательного введения клеточной взвеси необходимо подождать 5-10 секунд, чтобы убедиться в отсутствии вытекания препарата через перфорационное отверстие. Затем игла извлекается из яичка, причем ход ее осуществляется также параллельно капсуле яичка. Перфорационное отверстие зашивается цветной синей маркировочной нерастворимой лигатурой Prolene (7/0). Ее наличие необходимо для последующего нахождения трансплантационного канала и определения зоны возможной миграции трансплантированных стволовых клеток.

После завершения трансплантации яичко низводится в мошонку, с соблюдением мер предосторожности. После выполнения аналогичной трансплантации, с другой стороны, послеоперационная рана зашивалась. В яичке клеточная культура длительно может сохраняться в неизменном виде (рисунок 6).



Рисунок 5 – Техника введения обогащенных клеточных культур

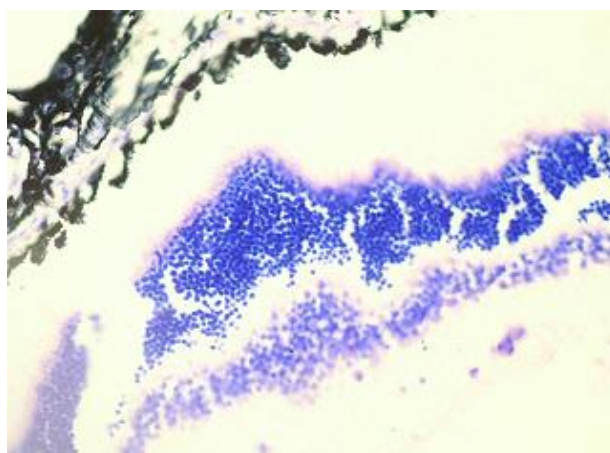


Рисунок 6 – Обогащенная клеточная культура в субкапсулярном пространстве на 14 сутки

#### *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 4.

Стволовые и прогениторные клетки ксеногенного происхождения 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 следующим образом. Клетки вымывали из костного мозга средой DMEM содержащей 2 мМ ЭДТА в качестве антикоагулянта. Затем суспензию клеток наслаивали на раствор фиколла-урографина (плотность 1,077 г/мл)

и центрифуговали 30 мин при 2000 g. Отбирали фракцию моноклеарных клеток на границе раздела фаз, ресуспендировали в среде и повторно центрифуговали 5 мин при 1500 g. 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.

Таблица 4 – Общая характеристика культур

Крысы линий Wistar и Campbell		
Номер серии	Серия	Кол-во животных
Ксеногенные культуры		
1	Культура человеческих мезенхимальных клеток, n	10
2	Культура человеческих клеток фетального яичка, n	10
3	Культура клеток человеческого костного мозга, n	10
4	Культура клеток плаценты человека, n	15
5	Культура клеток пуповины человека, n	15
6	Культура клеток яичка мышей линии C-57 Black/6, несущих ген GFP, n	10
7	Культура клеток висцеральной жировой ткани мышей линии C-57 Black/6, несущих ген GFP, n	10
7a	Культура МСК жировой ткани человека, n	12
Аллогенные культуры		
8	Обогащенная культура клеток яичка взрослой крысы линии Wistar, n	10
9	Обогащенная культура клеток яичка новорожденной крысы линии Wistar, n	10
Аутологичная культура		
10	Культура яичка взрослых крыс линии Campbell, n	10
Культуры для оценки специфичности маркеров и миграции трансплантированных клеток		
Крысы линий Wistar и Campbell		
11	Культура клеток яичка трансгенных мышей, несущих ген GFP, n	4
12	Культура стромы жировой ткани трансгенных мышей, несущих ген GFP, n	4
Мыши линии C57 Black/6 с введенным трансгеном GFP		
13	Культура клеток яичка трансгенных мышей, несущих ген GFP, n	4
14	Культура стромы жировой ткани трансгенных мышей, несущих ген GFP, n	4

Культуру стволовых и прогениторных клеток фетального яичка получали от плодов 16 недель гестации. Культивировали в стандартных пластиковых флаконах (75 см<sup>2</sup>, Corning, USA) при 37 °С в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в среде DMEM/F-12 (в соотношении 1:1) с добавлением 10% фетальной сыворотки телят (FCS), эпидермального ростового фактора (ЭФР) – 20 нг/мл. Культивирование проводили адгезивно, смену среды проводили каждые 3-5 суток, 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 стрептомицин и пенициллин в качестве антибиотиков и антимикотик фунгизон. После получения фрагментов размером 1 мм<sup>2</sup> к суспензии клеток добавляли клостридиальную коллагеназу до концентрации 0,2%, инкубировали на шейкере при температуре 37 °С в условиях атмосферы, содержащей 6% CO<sub>2</sub>. 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 1 100 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 фрагментировали на кусочки размером 1 мм, и после обработки коллагеназой, инкубировали, затем отмывали и подсчитывали, по методу, описанному выше.

При проведении анализа 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% CO<sub>2</sub> при 37 °С.

Увеличение функционального объема культур шло путем 4-5 пассирований в стандартных культуральных флаконах, на среде NEPEs, в CO-инкубаторе.

*Качественная и количественная оценка обогащенных клеточных культур*

Для трансплантации экспериментальным животным использовали культуру клеток 3-его пассажа, сравнительная жизнеспособность культур, определенная по трипановому синему, представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Сравнительная жизнеспособность культур при терапии

№	Название ксеногенной культуры	Дозы	Витальность культуры (по трипановому синему)	Количество животных в группе
Ксеногенные культуры				
1	Культура человеческих мезенхимальных клеток	500000 ЕД в 1 и 2 яичка	96-98%	10
2	Культура человеческих клеток фетального яичка	500000 ЕД в 1 и 2 яичка	96-98%	10
3	Культура клеток человеческого костного мозга	500000 ЕД в 1 и 2 яичка	96-98%	10
4	Культура клеток плаценты человека	500000 ЕД, 50000 ЕД, 5000 ЕД	92-97%	15
5	Культура клеток пуповины человека	500000 ЕД, 50000 ЕД, 5000 ЕД	92-97%	15



Продолжение таблицы 5

№	Название ксеногенной культуры	Дозы	Витальность культуры (по трипановому синему)	Количество животных в группе
6	Культура клеток яичка мышей линии C-57 Black/6, несущих ген GFP	50000 ЕД, 5000 ЕД	92-97%	10
7	Культура клеток висцеральной жировой ткани мышей линии C-57 Black/6, несущих ген GFP	500000 ЕД, 50000 ЕД,	92-97%	10
Аллогенные культуры				
8	Обогащенная культура клеток яичка взрослой крысы линии Wistar	500000 ЕД в 2 яичка	92-97%	10
9	Обогащенная культура клеток яичка новорожденной крысы линии Wistar	500000 ЕД в 2 яичка	92-97%	10
Аутологичные культуры				
10	Культура яичка взрослых крыс линии Campbell	500000 ЕД в 2 яичка	96-98%	10
Культуры для оценки специфичности маркеров и миграции трансплантированных клеток				
11	Культура клеток яичка трансгенных мышей, несущих ген GFP	500000 ЕД в 2 яичка	92-97%	8
12	Культура стромы жировой ткани трансгенных мышей, несущих ген GFP	500000 ЕД в 2 яичка	92-97%	8

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.

*Проведение моноорганной и билатеральной терапии*

На данном этапе работы проводился ряд вспомогательных экспериментов, посвященных изучению влияния моноорганной и билатеральной терапии культурами, обогащенными стволовыми / прогениторными клетками (таблица 6). То есть были выделены 3 группы животных. Первой группе животных (n=4) клеточная культура вводилась под белочную оболочку 1 яичка, а второй группе (n=6) культуральная взвесь вводилась билатерально, по методике, описанной выше.

Таблица 6 – Количество экспериментальных трансплантаций на этапе изучения эффектов клеточной трансплантации

№	Название операции	Количество манипуляций
1	Трансплантация клеточных культур, n	110
2	Введение специфичных маркеров, n	16
3	Всего операций, n	388
4	Осложнения терапии, n	0
Всего манипуляций:		604

#### *Транспортировка культур стволовых клеток*

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 (HAT), аминокислот и витаминов.

#### *Подготовка клеточных культур к экспериментальной терапии*

Полученные клеточные культуры центрифугировались при 1000 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 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 оба яичка экспериментального животного, из расчета 0,3-0,35 мл на 1 яичко, что контролировалось с помощью делений инсулинового шприца. Трансплантируемый объем в 1 яичко у крысы не должен превышать 0,3-0,35 мл, так как больший объем ведет к экзогенной компрессии семенных канальцев и их магистральных сосудов, что обуславливает возникновение местной ишемии тканей и нивелирует способность местных тканей к регенерации.

#### *Идентификация и контроль 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, которые представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Белки маркерного анализа культур, использованных в работе

Название маркера	Исследуемый процесс
Ost-4	Оценка «стволовости» трансплантированных культур
Dazl	Оценка трансформации ССК
Stella	Оценка дифференцировки ССК
DDX	Оценка дифференцировки ССК
N – кадхерин	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, оснащённом специальными фильтрами.

*Хранение культур, содержащих стволовые и прогениторные клетки*

Культуры хранили в среде, содержащей 85% FCS и 15% диметилсульфоксида в сосудах Дьюара, содержащих жидкий азот. При размораживании жизнеспособность клеток составляла 83-96%

*Оценка иммунологических характеристик полученных культур*

В результате работ по культивированию, были получены следующие культуры клеток, которые представлены в таблице 8 и на рисунках 7, 8.

Таблица 8 – Характериологические особенности некоторых используемых культур (совм. с Зарайским Е.И., 2010) [7, 14]

№	Культура	Характеристика культуры
А	Первичная культура яичка крыс породной группы Wistar	Видны фибробластоподобные, эпителиоидные и многочисленные делящиеся клетки. Культура получена с помощью коллагеназной обработки паренхимы яичка

## Продолжение таблицы 8

№	Культура	Характеристика культуры
B	Первичная культура стромы яичка фетуса человека	Культура не образовалась, на пластике видны только неподвижные сперматозоиды
C	Первичная культура яичка крыс породной линии Campbell репродуктивного возраста	Виден мощный монослойный рост клеток разного типа и бурную пролиферацию в культуре
D	Первичная культура яичка новорожденных крыс породной группы Wistar	Виден монослой, фокус и слабая пролиферация
E	Первичная культура плаценты человека	Виден мощный монослой, фокус и бурная пролиферация
F	Первичная культура пуповины человека	Виден фрагмент ткани, из которого расселяются клетки
G	Первичная культура мезенхимальных клеток фетуса человека	Видна типичная культура МСК

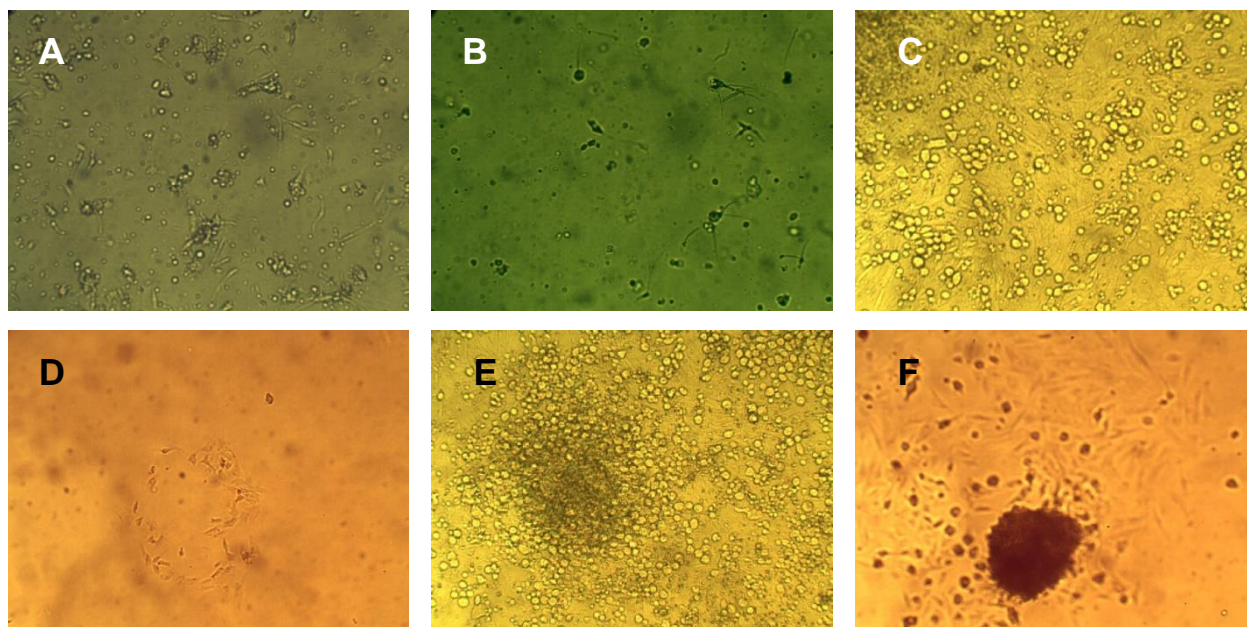


Рисунок 7 – Характеристика некоторых используемых культур  
(совм. с Зарайским Е.И., 2010) [7, 14]

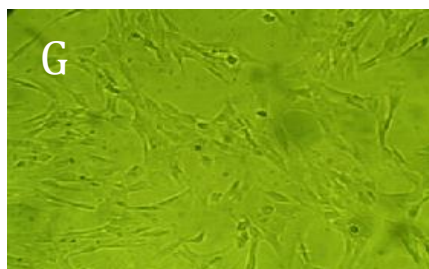


Рисунок 8 – Первичная культура мезенхимальных клеток фетуса человека  
(совм. с Зарайским Е.И., 2010) [7, 14]

*Подготовка раствора – плацебо в контрольной группе*

Четвертая группа животных с целью контроля получила инъекцию 6 мкл 0,9% раствора NaCl на 1 крысу. Раствор вводился с помощью инсулинового шприца, по методу, описанному выше.

*Иммуноферментный анализ (ИФА)*

*Непрямой ИФА: Плашки для анализа.* Для ИФА использованы полистироловые 96-ти луночные плоскодонные плашки фирм Dinatек, Nunc, Costar, Flow, НИИМТ и полихлорвиниловые фирмы Costar.

*Нанесение 1 слоя.* Для белковых антигенов, (в т.ч. и ИГ) использовали следующую процедуру нанесения 1 слоя. Белковые антигены наносили инкубацией в течение 1 часа при 37 °С в 50 мМ карбонатном буфере с рН 9,6 по 100 мкл раствора в лунку.

*Отмывка.* Отмывку производили на Washer (Flow, Англия) отмывочным буфером (ОБ), содержащим 0,1 BSA и 0,05% детергента Tween 20 в 50 мМ фосфатно-солевом буфере (PBS) с рН 7,2-7,4. Процедуру отмывки повторяли после нанесения каждого последующего слоя реакции для удаления несвязавшихся молекул АГ, забивочного белка, АТ и КГ.

*Забивка.* Для блокирования сайтов неспецифической сорбции на плате использовали 1% раствор BSA, желатины и овальбумина на фосфатно-солевом буфере. Инкубацию с забивкой проводили в течение 1 часа при 37 °С.

*Нанесение 2 слоя.* Антитела против антигенов 1 слоя наносили разведенными в отмывочном буфере по 100 мкл в лунку на 1 час при 37 °С. Повторную отмывку проводили как описано выше.

*Нанесение 3 слоя.* Антивидовой криоглобулин против иммуноглобулинов 2 слоя наносили по 100 мкл в лунку. Криоглобулин разводили на отмывочном буфере и инкубировали 1 час при комнатной температуре.

Реакцию проявляли раствором субстрата пероксидазы – 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 50 мМ цитратном буфере рН 4,0-4,7 с добавлением в качестве хромогена 0,04% раствор тетраметилбензидина. Проявляющую смесь готовили ex tempore и добавляли по 100 мкл в лунку. Инкубацию

проводили в течение 20 минут в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливали 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, осторожно добавляя по 50 мкл в лунку. Учет результатов проводили на Multiscan(Flow) при длине волны 450 нм.

*Процедура прямого ИФА.* Прямой ИФА проводили аналогично непрямому ИФА. Отличие состоит в том, что после второй отмывки следует нанесение криоглобулином и далее реакции проходят идентичные стадии.

*Процедура «сэндвич» ИФА.* Первой стадией «сэндвич» ИФА являлось нанесение антител (моносpezifических или моноклональных) в 50 мМ карбонатном буфере, при pH 9,6. Затем следовали отмывка, внесение антигена, вторая отмывка, внесение конъюгата антител (в случае моноклональных антител к другому эпитопу антигена) с пероксидазой хрена. Дальнейшую отмывку и окраску плашки проводили аналогично прямому и непрямому иммуноферментному анализу.

#### *Молекулярно-генетическая характеристика некоторых полученных культур*

Молекулярно-генетические исследования культур на наличие контаминации культур патогенными микроорганизмами проводили с помощью выявления цепной полимеразной реакции (ПЦР). Для этого были использованы киты производства фирмы «Литех» (Россия).

Первоначально исключали грибную и бактериальную контаминацию путем 3-х дневной культивации культур при 37 °С в среде без антибиотиков и антимикотиков и анализировали при помощи световой микроскопии при увеличении 1×1350.

Затем культуры исследовали методом ПЦР, согласно инструкции к китам на контаминацию микоплазмой, а человеческие дополнительно на наличие вирусов гепатитов В и С, а также ВИЧ. Результаты тестирования приведены в таблице 9.

Таблица 9 – Исследование бактериальной, грибковой, микоплазменной и вирусной контаминации полученных культур. Отриц.-контаминация не обнаружена, полож. – контаминация выявлена

Клеточная культура	Метод исследования				
	культуральный метод+ световая микроскопия	цепная полимеразная реакция			
		гепатит В	гепатит С	ВИЧ	микоплазма
Первичная культура яичка крыс породной группы Wistar, возраста 6 месяцев	отриц.	не исследовали	не исследовали	не исследовали	отриц.

Продолжение таблицы 9

Клеточная культура	Метод исследования				
	культуральный метод+ световая микроскопия	цепная полимеразная реакция			
		гепатит В	гепатит С	ВИЧ	микоплазма
Первичная культура яичка крыс породной линии Campbell репродуктивного возраста	отриц.	не исследовали	не исследовали	не исследовали	отриц.
Первичная культура яичка стромы яичка фетуса человека	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
Первичная культура МСК фетуса человека	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
Первичная культура яичка новорожденных крыс породной группы Wistar, в возрасте 1 месяц	отриц.	не исследовали	не исследовали	не исследовали	отриц.
Первичная культура яичка новорожденных крыс линии Campbell	отриц.	не исследовали	не исследовали	не исследовали	отриц.

Как видно из таблицы грибная, бактериальная, микроплазменная и вирусная контаминация полученных культур не выявлена, что дает возможность их использования в дальнейшей работе по имплантации на крысиной модели двухстороннего крипторхизма.

#### *Иммуноморфологические исследования*

Исследуемые ткани и культуры клеток фиксировали метанолом в течение 20 минут и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  в 10% растворе формалина не позднее 2-х часов после их получения от животных. В дальнейшем образцы хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . 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.

### ***Исследования третьего этапа работы***

#### ***Исследование фертильности экспериментальных животных***

Исследование фертильности экспериментальных животных проводилось по методикам, описанным в соответствующих разделах. Для этого выделялось по 4-6 животных из групп, которые перенесли терапию культурами, обогащенными сперматогенными стволовыми / прогениторными клетками, по 4 животных в аллогенном и аутологичном вариантах.

#### ***Определение контрольных сроков фертильности***

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

#### ***Определение минимальной терапевтической культуральной дозы***

В трех группах животных ксеногенного варианта при введении культуральной взвеси разделялись подгруппы, а сама культуральная взвесь, с помощью микропипетки разделялась на дозировки, представленные в таблице 4. Все остальные манипуляции, методы обследования и контроль, выполнялись согласно научному протоколу без отличия от дизайна у остальных групп, включая контрольную.

### ***Исследования четвертого этапа работы.***

#### ***Исследование влияния различных индукторов сперматогенной дифференцировки прогениторных клеток на поведение клеток после их трансплантации.***

#### ***Получение факторов дифференцировки стволовых и прогениторных клеток.***

#### ***Получение дифференцировочного супернатанта***

Семенник взрослой свиньи немедленно после извлечения помещали в среду, содержащую 48,5% среды RPMI1640, 48,5% среды DMEM, 3% фетальной бычьей сыворотки (FCS) и 2х количество антибиотиков для культуры клеток фирмы ICN (США) (АБ) и готовили из них культуру не позднее, чем через час после забора. Для приготовления культуры семенник отмывали 20 раз в среде Хэнкса, содержащей 3% FCS, глютамин, 2х АБ. Затем вскрывали



белочную оболочку, извлекали ткань и измельчали ее с помощью ножниц на фрагменты размером 1-2 мм в стерильных условиях. Полученные фрагменты отмывали трижды в среде Хэнкса, содержащей 3% FCS, глютамин, 2х АБ, и добавляли к фрагментам 10х количество по весу среды, содержащей 48,5% среды RPMI1640, 48,5% среды DMEM, 3% FCS, 2х АБ и 0,5% клостридиальной коллагеназы 4 типа. Суспензию инкубировали в течение 30 минут при 37 °С, фрагменты удаляли седиментацией при 1G. Супернатант удаляли и центрифугировали в течение 20 минут при 1 200 об/мин. Супернатант декантировали, а осадок, содержащий одиночные клетки, рассеивали на плоскодонные культуральные флаконы фирмы Nunc площадью 75 см<sup>2</sup> из расчета 500 тыс. клеток на флакон. Жизнеспособность клеток определяли с помощью витального красителя, содержащего бромистый этидий и акридиновый оранжевый. Под действием этого красителя при люминесцентном освещении живые клетки приобретают зеленую окраску, а мертвые – красную. Использовали те культуры, жизнеспособность в которых была не менее 85%. Полученные культуры культивировали в течение 3 суток при 37 °С в атмосфере, содержащей 6% CO<sub>2</sub>.

Затем собирали супернатант от полученных культур и добавляли в него различные фракции нейтрализованного препарата олигонуклеотидов (НПО), полученные, как описано в отчете по этапу № 3. Подробно, получение фракций описано выше.

#### *Получение фракций нейтрализованного препарата олигонуклеотидов (НПО)*

Фракции НПО получали методом разделения гидролизата РНК дрожжей вида *Torula yeast* (Sigma, США) по следующей методике: к 100 гр РНК дрожжей, растворенным в 1 л воды добавляли 300 мг РНКазы и проводили гидролиз при температуре 56° в течение 4-х часов. Выделяли низкомолекулярную олигонуклеотидную фракцию путем обратного диализа против воды. Полученный препарат олигонуклеотидов осаждали в течение ночи десятикратным объемом этанола при температуре 4 °С. Полученный препарат нейтрализовали 10М раствором NaOH (MERC, Германия), а затем трижды фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Полученный раствор высушивали, растворяли в дистиллированной воде, доводя концентрацию до 3%. Из полученного препарата получали 2 фракции путем диализа против фосфатно-солевого буфера с рН 7,2. Фракция А – содержимое диализного мешка после диализа 3%-го гидролизата в течение ночи при температуре 4 °С. Фракция В – содержимое емкости для диализа после диализа 3%-го гидролизата. После разделения фракцию А и фракцию В фильтровали через стерильный нитроцеллюлозный фильтр, лиофилизировали и хранили в стерильной посуде при 4 °С для приготовления дифференцировочных препаратов и анализа.

*Получение различных стимуляторов сперматогенной дифференцировки*

Для получения стимулятора А растворяли полученную фракцию А НПО в дифференцировочном супернатанте. Конечная концентрация фракции А в стимуляторе А составляла 3%.

Для получения стимулятора В, растворяли полученную фракцию В НПО в полученном дифференцировочном супернатанте. Конечная концентрация фракции В, в стимуляторе В, составляла 3%.

Стимуляторы А и В стерилизовали, пропуская через стерильный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, аликвотировали и хранили при температуре -20 °С.

*Получение стимулированных в сторону сперматогенеза культур клеток для изучения стимуляторов А и В*

Полученные культуры семенника трансгенных крыс линии Campbell были стимулированы в сторону сперматогенной дифференцировки, препаратами А и В по следующей методике:

Клетки сажали на чашки Петри (Nunc) диаметром 6 см на среду, содержащую RPMI 1640 – 80%, фетальную бычью сыворотку – 20%, антибиотики, антимикотики и глютамин из расчета 500 тыс. на чашку. После 2 суток культивации в атмосфере 6% CO<sub>2</sub> клетки помещали в бессывороточную среду (Панэко) и добавляли равный объем одной из дифференцирующих смесей, описанных выше. Инкубированные в таких средах клетки проверяли на контаминацию, которая не была обнаружена. Затем клетки снимали при помощи смеси, содержащей 50% раствора трипсина (Панэко) и 50% раствора Версена (Панэко). Подсчитывали жизнеспособность и вводили в яичко крысам Wistar (аллогенная ситуация) и Campbell (сингенная ситуация), подвергшимся операции двухстороннего крипторхизма в момент низведения яичек.

*Иммунорфологическое изучение эффекта введения аутологических и аллогенных культур клеток, индуцированных стимуляторами А и В*

Через два месяца после низведения яичек экспериментальных животных, опытных и контрольных крыс забивали методом цервикальной дислокации с предварительной дачей эфирного наркоза. Извлекали семенники, разрезали на 6-8 частей и фиксировали в 4%-м растворе забуференного параформальдегида, рН 7,2-7,4 в течение часа. Затем препараты отмывали PBS и приготавливали полутонкие срезы с помощью криостата.

Иммунорфологические исследования проводили с помощью моноклональных антител к маркерам яичка по следующей методике. На срезы наносили раствор моноклональных антител и инкубировали в течение одного часа при 37 °С во влажной камере. Отмывали раствором PBS, содержащим 0,1% BSA 3 раза, затем инкубировали 30 минут

с видоспецифическими антителами против иммуноглобулинов мыши, меченными флуоресцеином. Препараты микроскопировали на люминесцентном микроскопе фирмы Leitz при увеличении  $\times 600-1200$ . Было проведено иммуноморфологическое исследование, с использованием моноклональных антител к следующим маркерам: DAZL – ядра сперматогоний до и во время профазы мейоза; DDX4 – примордиальный маркер мужских половых клеток; Stella – маркер половых клеток.

Для иммунологического изучения имплантов необходимо было наличие антител, которые позволят дифференцировать человеческие и крысиные клетки яичка. Для получения таких антител была проведена работа по получению спермального антигена крысы, иммунизация кроликов полученным антигеном, получение антисыворотки к спермальному антигену крысы, очистки антител для дальнейшего использования в гистохимии и иммуноферментном анализе.

*Выделение, культивирование и приготовление препарата МСК, полученных из образцов жировой ткани 30 пациентов*

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) выделяли из подкожного жирового отложения здоровых доноров обоих полов, полученного при проведении дополнительного малого хирургического вмешательства под местной или общей анестезией в ходе плановых хирургических операций, проводившихся в МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова. Полученный биоматериал в стерильных условиях ламинарного бокса фрагментировали сосудистыми ножницами до консистенции суспензии, в виде мелких кусочков, размерами не более  $2 \text{ мм}^3$ , которые обрабатывали растворами ферментов коллагеназы I типа, объемом 200 ед/мл («Worthington Biochemical», США) и диспазы объемом 40 ед/мл («Sigma», Германия), при соотношении 1:2, как объем обрабатываемой ткани (в мл) к объему ферментативного раствора (в мл). Полученный образец ставили в инкубатор при  $37^\circ\text{C}$  в течение 30-45 мин и постоянно встряхивали. После завершения инкубационного периода добавляли равный объем ростовой клеточной среды для МСК и центрифугировали при 200 g не менее 8 мин. Ясно видимый более светлый поверхностный слой, состоящий из зрелых адипоцитов и кусочков ферментативно необработанной ткани, экстрагировали с помощью вакуумного насоса, а осадок, который состоял преимущественно из клеток стромы жировой ткани и клеток сосудистой стенки и крови, помещали в стерильную деионизованную воду, где суспендировали для разрушения сопутствующих эритроцитов, путем лизиса. Для восстановления осмотического давления, в образец добавляли соответствующий объем 10-кратного фосфатного буфера, с последующей фильтрацией через специальные нейлоновые фильтры с размером пор 100 мкм («BD Falcon Cell Strainer», США), а затем центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Полученный супернатант удаляли, а оставшийся осадок дополнительно ресуспендировали в среде, которая

поддерживает рост недифференцированных мезенхимных прогениторных клеток человека (Advance Stem Cell Basal Medium, далее – AdvanceSM, «HyClone», США), содержащей в своем составе 10% смеси факторов роста (Advance Stem Cell Growth Supplement, «HyClone») и 100 Ед/мл пенициллина/стрептомицина («HyClone»). Выделенные таким образом клетки по стандартной методике высаживали на чашки Петри («Corning», США) в концентрации  $5 \times 10^4 / \text{см}^3$  и инкубировали в  $\text{CO}_2$  – инкубаторе (5%  $\text{CO}_2$ ; 95% воздуха) при 37 °С. Через сутки в чашках меняли среду для удаления не прикрепившихся, и, следовательно, не обладающих признаками стволовости, клеток. Затем смену культуральной среды проводили один раз в 2-3 дня; при достижении 70-80% конфлюента клетки рассаживали в соотношении 1:3 с использованием раствора QTase (HyClone). Жизнеспособность клеток оценивали путем окраски клеток витальным красителем, а также раствором трипанового синего, с дальнейшим подсчетом количества живых и мертвых клеток с помощью Cell Counter, компании «Invitrogen» (США).

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

*Получение кондиционированной среды, содержащей секретом МСК ЖТ человека*

Для получения кондиционированной среды мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) 4-5 пассажа, клетки, достигшие 80% конфлюента, промывали трехкратно раствором Хэнкса («ПанЭко», Россия). К чашкам с культурой 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 300 g, 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 секретом 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 добавляли по 50 мкл 2,5% бычьего коллагенового геля («ИМТЕК», Россия), к которому в дальнейшем 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 культуральной среды DMEM-LG. После добавления необходимых компонентов содержимое пробирок быстро перемешивали Вортесом, центрифугировали в течение 1 минуты и набирали полученную смесь в стерильный инсулиновый шприц. Полученный биоматериал хранили на планшетах в холодильнике при температуре 4 °С, чтобы не допустить полимеризации геля, и, при необходимости извлекали и использовали для введения в течение 30 минут.

***Исследование возможностей метода трансплантации культур, обогащенных стволовыми /прогениторными МСК аутологичной природы***

В настоящей диссертации описано 6 клинических случаев, при которых использовалась трансплантация культур, обогащенных МСК аутологичной природы, при лечении безальтернативных ситуаций с преодолением фактора инфертильности у мужчин, имевших в анамнезе несколько курсов стимулирующего сперматогенез лечения, в том числе ВРТ, и здоровых женах (таблица 10). Данные пациенты обследовались и лечились на базе ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства Здравоохранения РФ, г. Москва (директор, академик РАН, д.м.н. Сухих Г.Т.) в период 2009-2010 г. и период 2016-2019 г., по решению ученого совета и локального этического комитета ФГБУ НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии Минздрава РФ. Клинический этап обследования был проведен на базе научно-поликлинического отделения, культуральные работы на базе лаборатории клинической иммунологии. Пациентам проведен стандартный алгоритм обследования, сперматологического обследование, исследование МАР теста, фрагментаций ДНК, исключение экстрагенитальных причин инфертильности. Все пациенты в анамнезе имели 2-4 курса консервативной стимулирующей терапии, с нестабильным клиническим эффектом. Ввиду наличия стойких нарушений им было предложено проведение терапии обогащенными стволовыми клеточными культурами аутологичной природы.

Таблица 10 – Клинические случаи стойкой инфертильности у пациентов перед использованием терапии культурами, обогащенными МСК аутологичной природы

№	Пациент	Возраст	Диагноз	Исход
1	Х.О.А.	37 лет	Рецидив варикоцеле слева. Астенотератозооспермия высокой степени	Беременность

Продолжение таблицы 10

№	Пациент	Возраст	Диагноз	Исход
2	Б.А.С	28 лет	Иммунологическое бесплодие. Непроходимость семявыносящего протока, с одной стороны	Беременность
3	С.А.А.	33лет	Астенозооспермия. Иммунный фактор инфертильности	Беременность
4	Ш.Х.И.	56 лет	Идиопатическая олигоастенотератозооспермия (криптозооспермия)	Беременность
5	Б.С.М.	44 лет	Олигоастенотератозооспермия, гипергонадотропная форма, микроделеция AZFc (SY 1192)	Беременность
6	С.К.Н.	27 лет	Идиопатическая олигоастенотератозооспермия, нормогонадотропная форма	Беременность

Подготовка клеточных культур проводилась по методикам, описанным в соответствующих разделах настоящей работы, клиническая часть (в т.ч. протоколы ВРТ) на базе научно-поликлинического отделения ФБГУ НМИЦ АГ и П им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения РФ. Схемы введения, дозы клеточной массы и кратность введения в каждом случае определялась индивидуально.

#### ***Методы статистической обработки***

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 ( $\sigma$ ). 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  $\chi^2$  Пирсона или, при необходимости, точного критерия Фишера. При уровне значимости  $p \leq 0,05$  различия считали достоверными (статистически значимыми).

### Глава 3

## АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ СПЕРМАТОГЕНЕЗА ПРИ УЧАСТИИ ПАЦИЕНТОВ В ПРОГРАММЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

### 3.1 Клиническая характеристика мужчин с инфертильностью

При анализе результатов обследования 1 012 супружеских пар у 76 пар (7,5%) выявить причину не наступления беременности, несмотря на весь комплекс проведенных обследований согласно стандартным протоколам, 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 анализа результатов коррекции сперматогенеза и оценки эффективности процедур ВРТ, нами были отобраны 292 мужчин (28,8%) с преобладающим фактором инфертильности и здоровыми женами. Остальные 262 пациента, имеющие обоюдные с партнершами факторы отягощенности, лечились согласно выявленным факторам риска, но в исследование не включались. 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%). Таким образом, общее количество пациентов с известными причинами мужского бесплодия составило 196 человек (19,36%) от общего количества обследованных пар. Причины инфертильности у этих мужчин представлены в таблице 11.

Представленные в таблице 11 данные по причинам инфертильности коррелируют с распространенностью этих факторов в общей популяции пациентов и в группе всех пациентов с мужским фактором бесплодия. В общей группе носительство инфекции, передающиеся половым путем, было выявлено у 120 пациентов (61,2%), хронический простатит был выявлен в 50,0% пациентов, варикоцеле было обнаружено у 42 пациентов (21,4%). В исследуемых группах встречались отдельно были выделены 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. Согласно данным,

представленным в таблице 3.2 единственную явную причину infertility имели 88 пациентов (37,6%). У пациентов с крипторхизмом, одновременно присутствовали эндокринный и воспалительный факторы infertility, у пациентов с варикоцеле встречались инфекции, передающиеся половым путем (ИППП) и т.д. У пациентов с идиопатической формой infertility также встречались все варианты изменения спермограммы.

Спермиологическая картина у этих пациентов в зависимости от распределения провоцирующих факторов представлена в таблице 11.

Таблица 11 – Причины infertility у пациентов с известным преобладающим мужским фактором (абс., %)

Нозология	n, %	Возрастные группы				
		до 25	26-29	30-35	36-39	≤40
Всего (пациентов)	196	15	77	57	55	10
ИППП	120 (61,2%)	5 (33,3%)	24 (31,1%)	54 (94,7%)	35 (63,6%)	2 (20,0%)
Хронический простатит	98 (50,0%)	4 (26,6%)	28 (36,3%)	35 (61,4%)	24 (43,6%)	7 (70,0%)
Варикоцеле	42 (21,4%)	1 (6,66%)	10 (12,9%)	16 (28,0%)	15 (27,2%)	–
Крипторхизм	10 (1,25%)	2 (13,3%)	3 (3,89%)	3 (5,2%)	2 (3,6%)	–
Аномалии строения половых органов	7 (3,57%)	1 (6,66%)	2 (2,59%)	2 (3,5%)	2 (3,6%)	–
Опухоли репродуктивной системы	2 (1,02%)	–	–	1 (1,7%)	–	1 (10,0%)
Иммунологический фактор (АСАТ и HLA конфликт)	23 (11,7%)	–	2 (2,59%)	11 (19,2%)	9 (16,3%)	1 (10,0%)
Генетический фактор	21 (10,7%)	–	5 (6,49%)	9 (15,7%)	4 (7,27%)	3 (30,0%)
Эндокринный фактор	12 (6,12%)	2 (16,6%)	3 25,0%	3 25,0%	2 16,6%	2 16,6%



Согласно полученным результатам нормальную (по критериям Крюгера) спермограмму имели 39 (13,3%) пациентов из 292, причем в группе с идиопатическими формами пациентов с нормальными показателями эякулята выявлено не было. У 4 пациентов условно нормальные показатели спермограммы были выявлены несмотря на наличие более 2 провоцирующих инфертильность факторов (10,2%).

Распространенность олигоспермии, как фактора инфертильности, была выявлена у 58 пациентов (19,8%) (таблица 12).

Таблица 12 – 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%)

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 инфертильности. Азооспермия встретилась у 27 пациентов, причем 15 (55,5%) из них находились в когорте с идиопатическими формами.

### **3.2 Результаты лечения инфертильности у мужчин с инфекциями передающимися половым путем**

В группе пациентов с инфекциями передающимися половым путем было 120 супружеских пар. Все они получили соответствующую терапию в зависимости от вида

выявленного возбудителя. Микробный спектр выявленных возбудителей представлен на диаграмме 1.

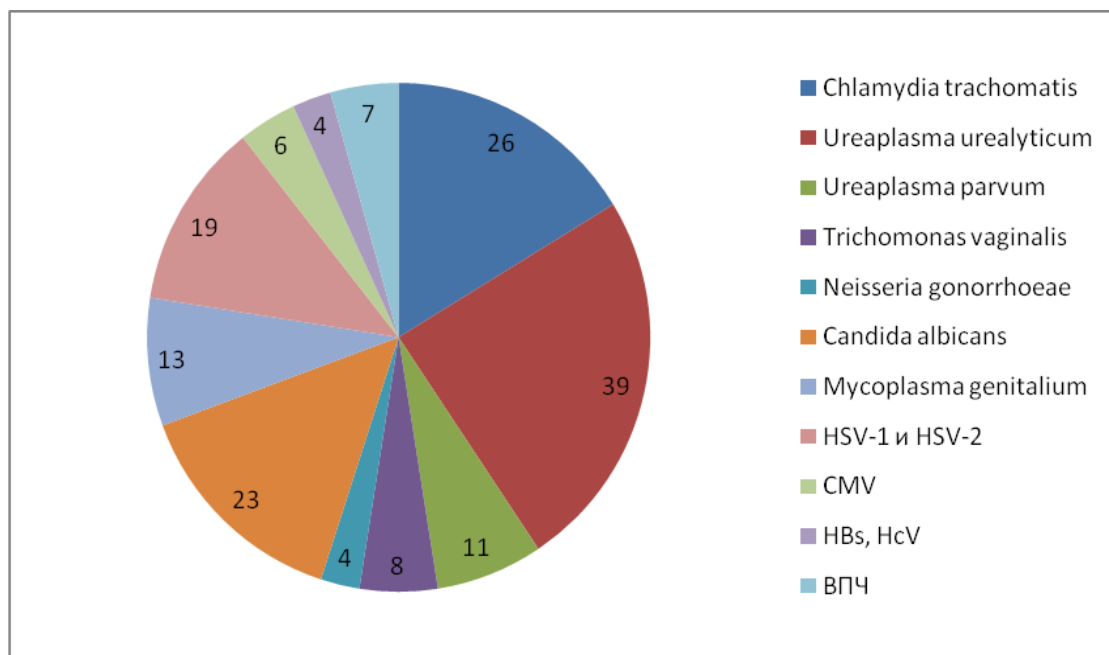


Диаграмма 1 – Микробно-вирусный спектр выявленных возбудителей и вирусов (n=120)

Согласно проведенному обследованию из 120 пациентов было выявлено, что у 87 пациентов была выявлена, по крайней мере 1 инфекция, у 27 пациентов имелось 2 инфекции сразу, у 6 пациентов более 2 инфекций. На представленной диаграмме видно, что у 21,6% была выявлена *Chlamydia trachomatis*, у 32,5% – *Ureaplasma urealyticum*. Таким образом, 53,5% пациентов имели поражение инфекциями, имеющих доказанное негативное воздействие на сперматогенез. В исследуемой популяции также высока была контаминация грибковыми инфекциями – 23 случая (19,1%), а также вирусами генитального герпеса I и II типа – 19 случаев (15,8%). Гонококковая инфекция, поражения вирусами гепатита Б и С, а также цитомегаловирусом были представлены единичными случаями. ВПЧ встречался в 7 случаях (5,83%).

Всем пациентам проводилось комбинированное лечение на основе антибактериальной, противовоспалительной и иммуномодулирующей терапии. Большиншей части пациентов (n=68, 56,6%) удалось устранить инфекцию после первого же курса лечения, 52 пациентам (43,3%) понадобилось проведение повторных курсов, в связи с индивидуальными особенностями состава микробной популяции. Результаты лечения пациентов с ИППП представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Результаты лечения infertility пациентов с ИППП (абс., %)

Пациенты с ИППП (n=120); n, %	До лечения	Изменения после 1 курса лечения	Изменения после 2 курса лечения	После 1 ICSI	После 2 ICSI
Нормозооспермия	2; 1,6%	15; 13,1%*	23; 20,7%**/**	13; 14%	10; 12,5%
Олигозооспермия	32; 26,6%	23; 20,1%	21; 18,9%	15; 16,1%	14; 17,5%
Астенозооспермия	56; 46,6%	46; 40,3%	40; 36,0%**	35; 37,6%	26; 2,5%
Тератозооспермия	23; 19,1%	23; 20,1%	23; 20,7%	23; 24,7%	23; 28,7%
Азооспермия	7; 5,83%	7; 6,1%	7; 6,3%	7; 7,52%	7; 8,75%
<b>Количество беременностей</b>	–	<b>6; 5,0%</b>	<b>9; 7,5%</b>	<b>27; 22,5%</b>	<b>40; 33,3%</b>

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 ( $p \leq 0,05$ ); значимость различия в отношении наступления беременностей представлена на отдельном рисунке ниже.

Графическое представление полученных данных для количества беременностей представлено на диаграмме 2.

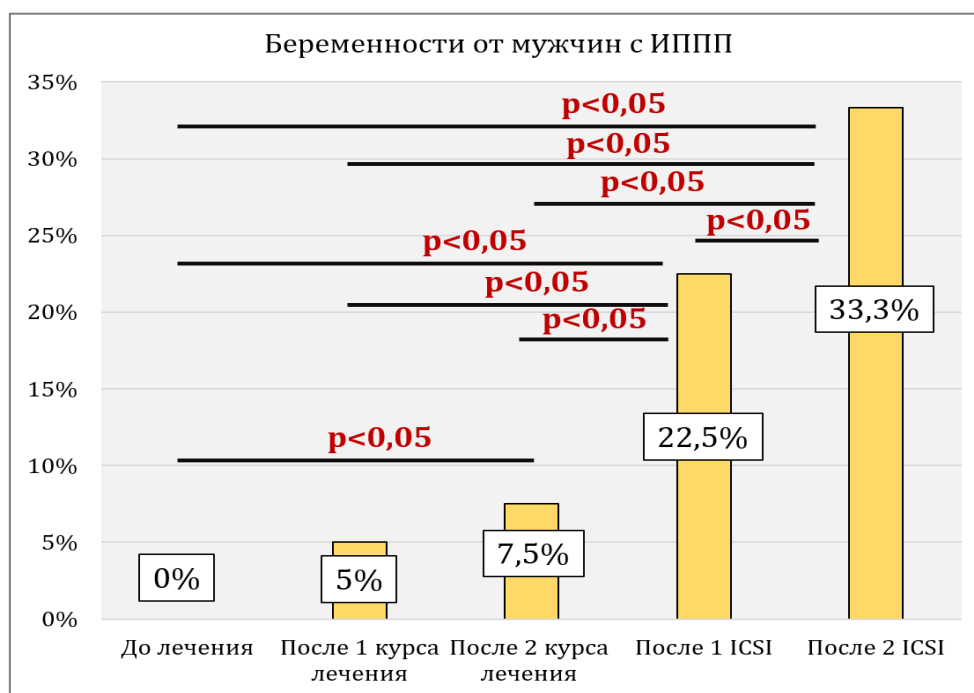


Диаграмма 2 – Количество благоприятных исходов лечения infertility мужчин с фактором ИППП

Согласно данным таблицы 13 выявлено, что после успешной эрадикации возбудителя (1-2 курса), передающегося половым путем, удалось увеличить количество пациентов с нормоспермией с 2 до 15 (на 13,1%), за счет преимущественной коррекции олиго и астенозооспермии. При этом удалось добиться возникновения 9 беременностей (7,5%). Проведение двух стимулирующих сперматогенез трехмесячных курсов не привело к существенному улучшению качества спермограмм.

Тем не менее, на цикл ВРТ в данной группе были направлены 111 супружеских пар. После завершения 1 цикла ЭКО (ICSI) удалось добиться еще 18 беременностей, (всего – 27), доведя общее количество беременностей до 22,5%. После завершения 2 цикла ЭКО (ICSI) удалось добиться еще 13 беременностей, доведя общее количество беременностей до 40 (33,3%).

Таким образом, в группе пациентов с ИППП после проведенного лечения инфекций, после стимулирующих курсов и 2 циклов ЭКО (ICSI) удалось добиться беременности в 33,3% случаев. У 80 пар добиться беременности не удалось. По всей видимости, для этих пар нужно большее количество попыток ЭКО (ICSI), либо другие методы лечения.

### **3.3 Результаты лечения infertility у мужчин с хроническим простатитом**

В группе пациентов с различными формами хронического простатита наблюдалось 98 пациентов. В эту группу были включены пациенты, имеющие уровень лейкоцитов в спермограмме более 1 000 000 (более 1,0 в 1 мл), специфические жалобы на боли различного характера, отдающие вниз живота, промежность, внутреннюю поверхность бедра, мошонку, корень полового члена и имеющие участки повышенной эхогенности в ткани простаты при УЗИ (ТРУЗИ) исследовании. Этим пациентам проводилось исследование секрета простаты для подтверждения диагноза N41.1 Хронический простатит (наличие более 10 лейкоцитов в п/з), выявления и определения чувствительности микрофлоры. У 14 пациентов (14,2%) была выявлена микробная флора, которая потребовала назначения антибактериальных препаратов. Микробный спектр секрета простаты представлен на диаграмме 3.

После проведенного лечебного и антибактериального курса удалось добиться эрадикации возбудителей у 9 пациентов (64,28%). Пяти оставшимся пациентам был проведен повторный курс лечения антибиотиком другой фармакологической группы, что позволило добиться эрадикации возбудителей еще у 3 пациентов. Таким образом, общая эффективность лечения хронического бактериального простатита составила 85,7%.

После проведенного лечения простатита сперматологические нарушения удалось устранить у 18 пациентов (19,3%), на фоне чего выявлено 5 беременностей (5,1%).

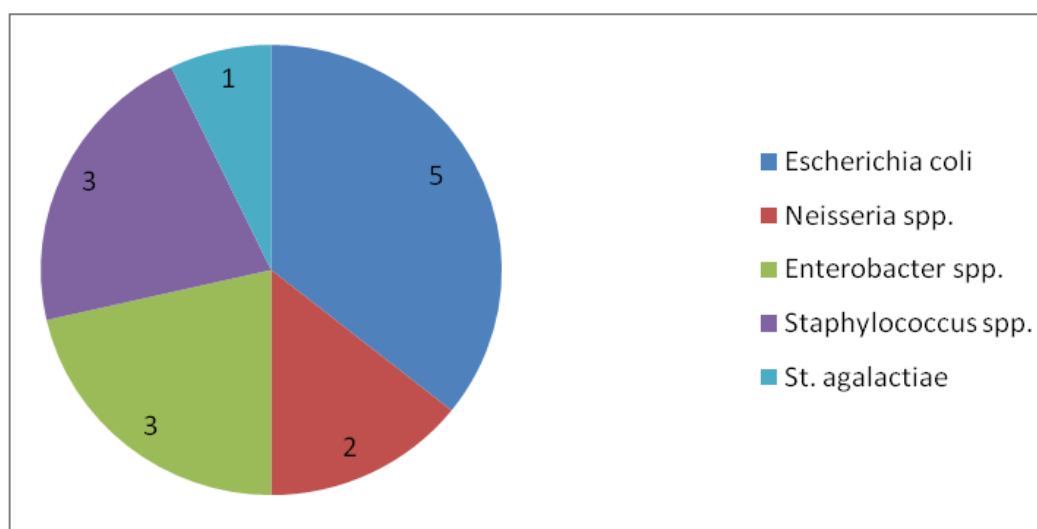


Диаграмма 3 – Спектр микробных возбудителей у пациентов с простатитом и infertility

После двух курсов стимуляторами сперматогенеза отмечена нормализация спермиологической картины еще у 25 пациентов (48,3%), что сопровождалось появлением еще 4 беременностей в данной группе (9,18%). Результаты проводимого лечения представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Результаты лечения infertility у мужчин с хроническим простатитом (абс., %)

Пациенты с простатитом (n=98), n; %	До лечения	Изменения после 1 курса лечения	Изменения после 2 курса лечения	После 1 ICSI	После 2 ICSI
Нормозооспермия	–	18; 19,3%*	43; 48,3%**/****	46; 54,7%	45; 68,1%
Олигозооспермия	21; 21,4%	13; 13,9%*	8; 8,98%**	7; 8,33%	4; 6,06%
Астенозооспермия	62; 63,2%	48; 51,6%	26; 29,2%**/****	19; 22,6%	5; 7,57%
Тератозооспермия	12; 12,2%	11; 11,8%	9; 10,1%	9; 10,7%	9; 13,6%
Азооспермия	3; 3,0%	3; 3,22%	3; 3,37%	3; 3,57%	3; 4,54%
<b>Количество беременностей</b>	–	<b>5; 5,1%</b>	<b>9; 9,18%</b>	<b>14; 14,2%</b>	<b>32; 32,6%</b>

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 ( $p \leq 0,05$ ); значимость различия в отношении наступления беременностей представлена на отдельном рисунке ниже.

Графическое представление полученных данных для количества беременностей представлено на диаграмме 4.

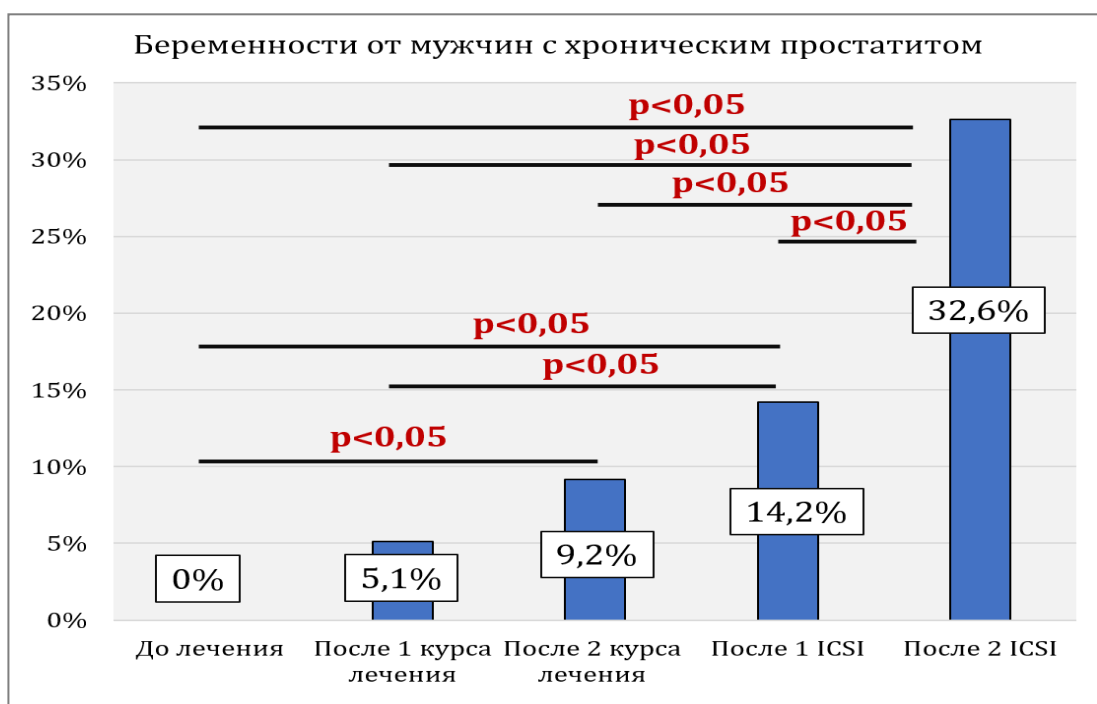


Диаграмма 4 – Количество благоприятных исходов лечения инфертильных мужчин с хроническим простатитом

Согласно данным, представленным в таблице 14 выявлено, что добиться беременности после лечения простатита и двух стимулирующих курсов удалось у 9 супружеских пар (9,18%). Тем не менее, 89 парам (90,8%) пришлось участвовать в программе ЭКО (ICSI). После первого цикла ЭКО (ICSI) было получено еще 5 беременностей и удалось довести суммарную эффективность лечения до 14 (14,2%), после второго цикла было получено еще 18 беременностей, что позволило поднять показатель успешности репродуктивного лечения у пар до 32,6%. Таким образом суммарная эффективность лечения инфертильности у пациентов с простатитом составила 32,6% – 32 беременности, в том числе у 2 пациентов с тератоспермией (16,6%). У 66 пар лечение простатита на фоне 2 стимуляционных курсов и двух циклов ЭКО (ICSI) к появлению беременностей у пары не привело.

### 3.4 Результаты лечения инфертильности у мужчин с варикоцеле

В данной группе с диагнозом I86.1 Варикоцеле, было исследовано 42 пациента. У 39 пациентов (92,8%) определялось варикоцеле слева, у 3 пациентов – расширение вен

гроздьевидного сплетения было выявлено с двух сторон (7,2%). У этих пациентов на фоне варикоцеле были выявлены нарушения спермограммы, что послужило одним из показаний для оперативного лечения. Результаты проведенного лечения представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Результаты лечения пациентов с бесплодием на фоне варикоцеле (абс., %)

Пациенты с варикоцеле (n=42), n; %	До операции	Изменения после операции	После наблюдения в течение 6 месяцев и стимуляционного курса	После 1 ICSI	После 2 ICSI
Нормозооспермия	–	–	17; 40,4%**/***	18; 42,8%	18; 42,8%
Олигозооспермия	10; 23,8%	10; 23,8%	4*; 9,5%**/***	4; 9,5%	4; 9,5%
Астенозооспермия	20; 47,6%	20; 47,6%	11*; 26,2%**/***	10; 23,8%	10; 23,8%
Тератозооспермия	10; 23,8%	10; 23,8%	8*; 19,0%	8; 19,0%	8; 19,0%
Азооспермия	2; 4,7%	2; 4,7%	2; 4,7%	2; 4,7%	2; 4,7%
<b>Количество беременностей</b>	–	–	<b>7; 16,6%</b>	<b>17; 40,5%</b>	<b>21; 50,0%</b>

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 ( $p \leq 0,05$ ); значимость различия в отношении наступления беременностей представлена на отдельном рисунке ниже.

Графическое представление полученных данных для количества беременностей представлено на диаграмме 5.

Часть пациентов (n=18, 42,8%) перенесла операцию Иванисевича, 13 пациентов – микрохирургическую перевязку яичковых вен по Мармару (30,9%), 8 пациентов – лапароскопическое клипирование яичковых вен (19,0%), и 3 пациента – флебосклерозирование яичковых вен (7,14%). При наблюдении в течение 6 месяцев, во время проведения стимуляционных курсов, рецидивов варикоцеле, гидроцеле и других осложнений выявлено не было.

Согласно данным, представленным в таблице 15, оперативное лечение варикоцеле в раннем послеоперационном периоде не оказало существенного влияния на изменения спермиологического анализа у пациентов этой когорты. Тем не менее, реабилитационный курс, проводимый в течение 6 месяцев после операции позволил нормализовать спермиологическую картину у 17 пациентов (40,4%), и привел к появлению 7 беременностей. Нормализация сперматогенеза на фоне лечения произошла у 6 пациентов с олигозооспермией (40,0%), 9 пациентов с астенозооспермией (55,0%) и 2 пациентов с тератозооспермией (20,0%).

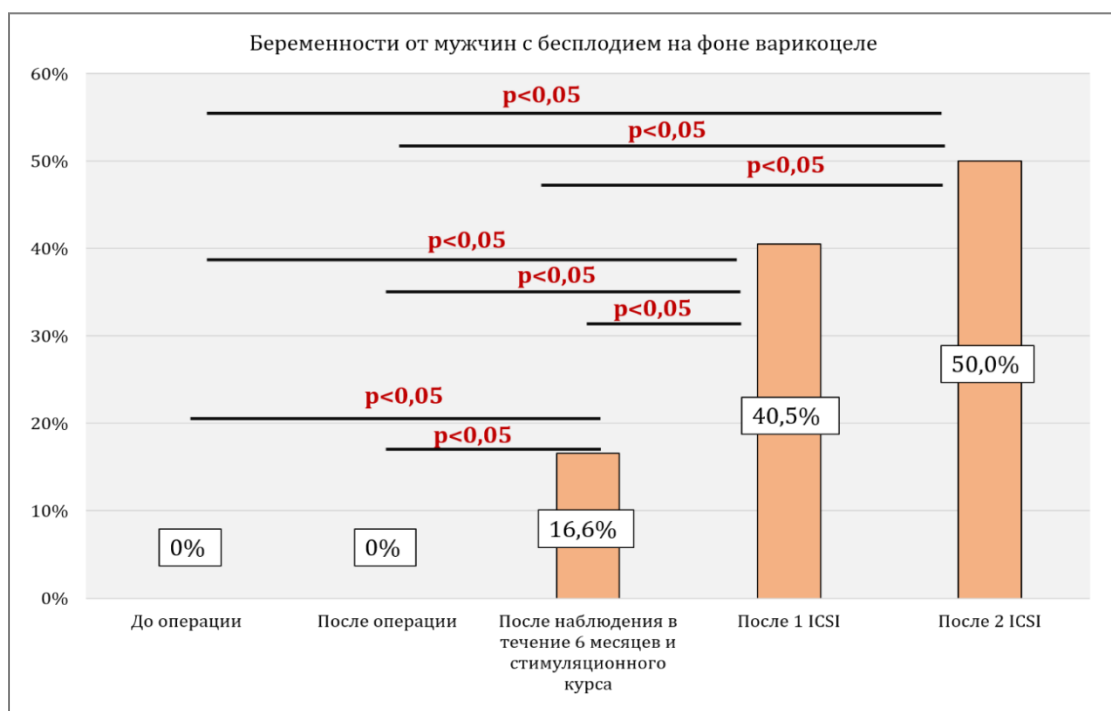


Диаграмма 5 – Количество благоприятных исходов лечения инфертильных мужчин с варикоцеле

Использование двух циклов ЭКО (ICSI) позволило добиться наступления беременности еще у 14 пар (33,3%). В 21 случае получить наступление беременности не удалось (50,0%). Таким образом, общая эффективность решения проблемы с инфертильностью в данной когорте составила 50% (n=21).

### 3.5 Результаты лечения инфертильности у мужчин с крипторхизмом

В этой когорте пациентов с преимущественно мужским фактором инфертильности, было всего 10 (6,2%). Из этих 10 пациентов 9 перенесли орхопексию с одной стороны, у 1 пациента (10,0%) орхопексия была выполнена с двух сторон. Все эти пациенты росли и развивались согласно возрастным нормативам, но с началом семейной жизни обратились с проблемой инфертильности. Этим пациентом было проведено 2 курса стимулирующей терапии (ХГч – Хумегон) и два цикла ЭКО (ICSI). Результаты лечения пациентов с крипторхизмом представлены в таблице 16.

Согласно данным таблицы 16 после двух курсов стимулирующей сперматогенез терапии была достигнута нормоспермия у 30,0% пациентов. Улучшение произошло у пациентов



с олигозооспермией и астенозооспермией и коэффициент улучшения составил 50,0%. Кроме того, было зафиксировано 2 беременности на фоне стимуляционной терапии (20,0%).

Таблица 16 – Результаты лечения пациентов с бесплодием обусловленным перенесенным крипторхизмом (абс., %)

Пациенты после орхопексии (n=10)	n, %	После наблюдения в течение 6 месяцев	После 1 ICSI	После 2 ICSI
Нормозооспермия	–	3; 30,0%*	4; 30,0%	3; 30,0%
Олигозооспермия	4; 44,4%	2; 16,6%*	1; 10,0%	1; 10,0%
Астенозооспермия	2; 16,6%	1; 10,0%	1; 10,0%	1; 10,0%
Тератозооспермия	2; 16,6%	2; 16,6%	2; 16,6%	2; 16,6%
Азооспермия	2; 16,6%	2; 16,6%	2; 16,6%	2; 16,6%
<b>Количество беременностей</b>	–	<b>2; 20,0%</b>	<b>3; 30,0%</b>	<b>7; 70,0%</b>

Примечание – \*– достоверность различий между 1 и 2 контрольными точками ( $p \leq 0,05$ ); значимость различия в отношении наступления беременностей представлена на отдельном рисунке ниже.

Графическое представление полученных данных для количества беременностей представлено на диаграмме 6.

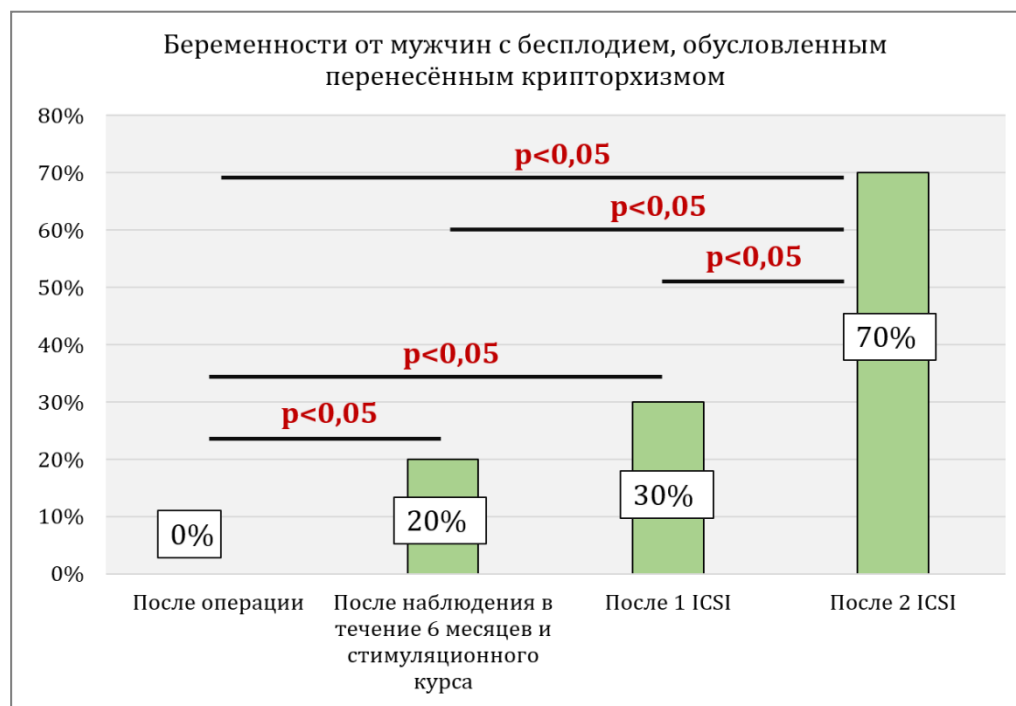


Диаграмма 6 – Количество благоприятных исходов лечения инфертильных мужчин с крипторхизмом

После двух циклов ЭКО (ICSI) количество беременностей в этой когорте достигло 7 (70,0%). В 3 парах (30,0%) бесплодных по мужскому фактору беременности получить не удалось.

### 3.6 Результаты лечения infertility у мужчин с аномалиями строения половых органов и опухолями органов мочеполовой системы

В данной когорте было 7 пациентов. У этих пациентов в 4 случаях имелись различные варианты гипоспадии уретры, у 1 пациента была атрезия семявыносящих протоков с двух сторон, и у 2 пациентов имелась обструкция семявыносящих протоков. Этим пациентам была использована различная тактика. У четырех пациентов эякулят был получен естественным путем, которые в дальнейшем был использован при внутриматочной инсеминации. У пациентов с атрезией и обструкцией семявыносящих протоков материал был получен в клинике ВРТ с помощью TESE. У этой когорты пациентов стимуляционных курсов не проводилось.

Кроме того, в этом разделе рассматриваются и 2 пациента в возрасте старше 50 лет с установленным диагнозом рак предстательной железы. У этих пациентов материал был получен естественным путем перед началом лучевой терапии (брахитерапии). Полученный тем или иным способом материал обрабатывался и затем был использован в цикле ЭКО (ICSI).

Результаты проведенного лечения infertility указаны в таблице 17.

Таблица 17 – Результаты лечения пациентов с бесплодием обусловленным аномалиями и опухолями репродуктивной системы (абс., %)

Пациенты с аномалиями и онкологией (n=9)	n, %	После 1 ICSI	После 2 ICSI
Нормозооспермия	2; 22,2%	2; 22,2%	2; 22,2%
Олигозооспермия	2; 22,2%	2; 22,2%	2; 22,2%
Астенозооспермия	1; 11,1%	1; 11,1%	1; 11,1%
Тератозооспермия	1; 11,1%	1; 11,1%	1; 11,1%
Азооспермия	3; 33,3%	3; 33,3%	3; 33,3%
<b>Количество беременностей</b>	–	<b>2; 22,2%</b>	<b>6; 66,6%</b>

Таким образом, эффективность лечения «механических» факторов infertility оказалось эффективным в 66,6% случаев, но изменения были статистически незначимы. У трех пациентов с азооспермией после двух циклов ЭКО (ICSI) достичь беременности не удалось.

Графическое представление полученных данных для количества беременностей представлено диаграмме 7.

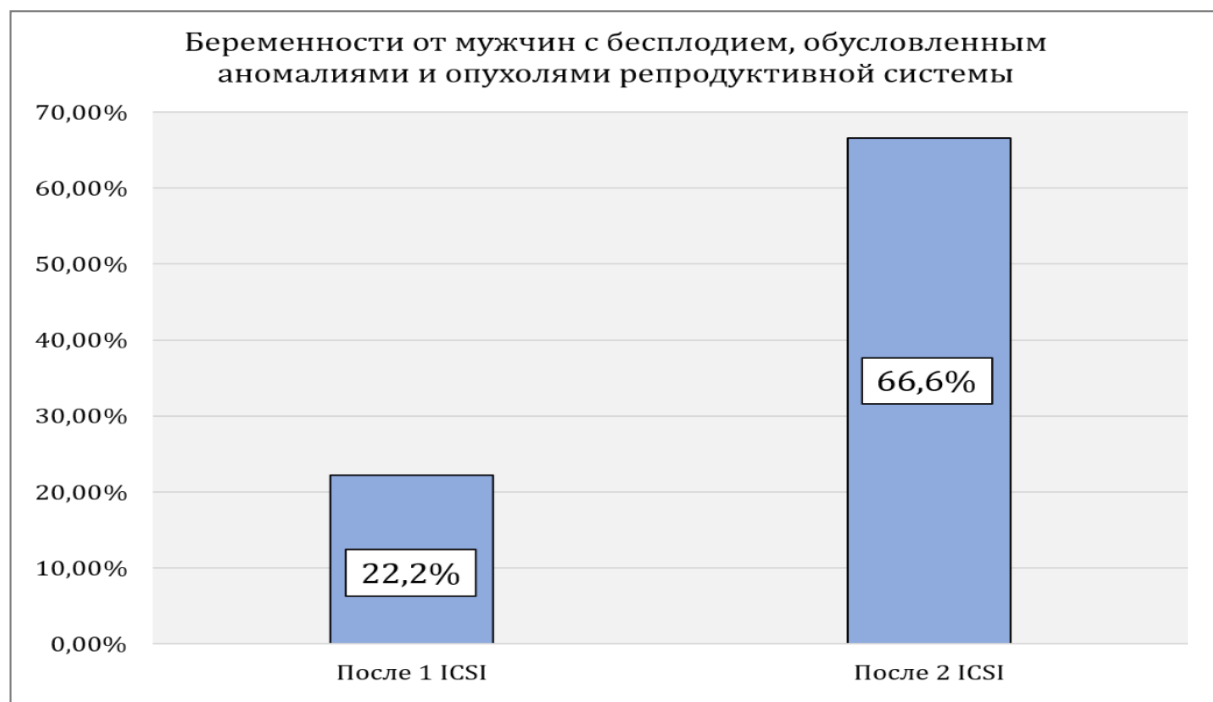


Диаграмма 7 – Количество благоприятных исходов лечения infertильных мужчин с аномалиями строения и опухолями органов репродуктивной системы

### 3.7 Результаты лечения infertильности у мужчин с иммунологическим фактором

В этой группе наблюдались пациенты с клинически значимым уровнем антиспермальных антител, определенных методом MAR, более 10% (n=18), а также пациенты с аллогенностью по HLA-антигенам, причем 3 пациента имели количество совпадений до 50% и 2 пациента имели совпадения по локусам HLA от 50 до 100%.

Пациенты с клинически значимым титром АСАТ получили два курса терапии Эмоксипином, затем стимуляционный курс для повышения активности сперматогенеза и 2 цикла ЭКО (ICSI). Пациенты с установленной аллогенностью после проведения стимуляционного сперматогенного курса сразу включались в программу ЭКО (ICSI). Результаты проведенного лечения представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты лечения пациентов с бесплодием, обусловленным иммунологическими факторами (абс., %)

Пациенты с иммунным фактором (n=23)	n, %	После лечения АСАТ и стимуляции	После 1 ICSI	После 2 ICSI
Нормозооспермия	1; 4,34%	5; 21,7%*	5; 21,7%	4; 17,4%
Олигозооспермия	7; 30,4%	4; 17,4%	4; 17,4%	5; 21,7%
Астенозооспермия	7; 30,4%	6; 26,0%	6; 26,0%	7; 30,4%
Тератозооспермия	6; 26,0%	5; 21,7%	5; 21,7%	5; 21,7%
Азооспермия	2; 8,7%	2; 8,7%	2; 8,7%	24; 8,7%
<b>Беременности</b>	–	<b>2; 8,7%</b>	<b>6; 26,0%*</b>	<b>12; 52,1%**/**</b>

Примечание – \* – достоверность различий между 1 и 2 контрольными точками ( $p \leq 0,05$ ); значимость различия в отношении наступления беременностей представлена на отдельном рисунке ниже.

Графическое представление полученных данных для количества беременностей представлено на диаграмме 8.

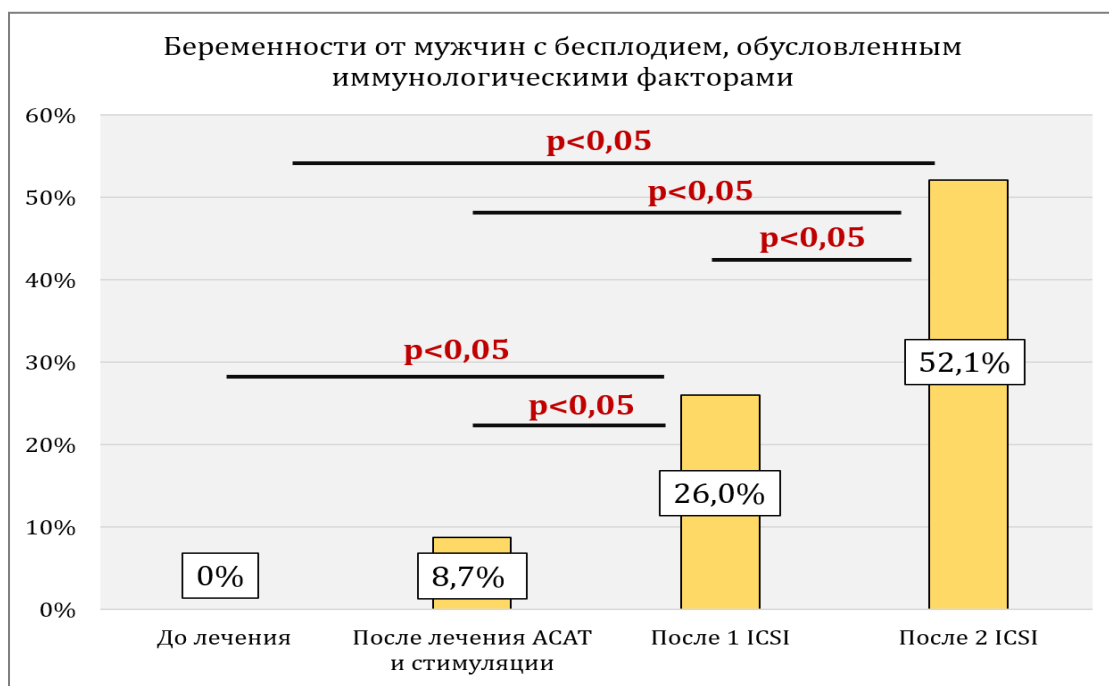


Диаграмма 8 – Количество благоприятных исходов лечения инфертильных мужчин с иммунологическими факторами

Согласно данным, представленным в таблице 18 проведение стимуляционных курсов и курсов лечения, направленных на снижение титра антиспермальных антител, позволили

достичь нормоспермии у 4 пациентов (17,4%). Два пациента имели клинически значимый уровень АСАТ, и у двух был HLA конфликт по аллогенному варианту. У этих пациентов к моменту завершения стимулирующей терапии развилось 2 беременности (8,7%). После первой процедуры ЭКО, методом ICSI удалось добиться еще 4 беременностей в группе, суммарно 26,0%, а после второго еще 6 (большинство из группы пациентов с АСАТ). Таким образом, суммарный показатель успешности терапии мужской инфертильности в этой группе составил 52,1%. У 11 пар достичь долгожданной беременности не удалось.

### 3.8 Результаты лечения инфертильности у мужчин с генетическим фактором

Пациенты этой группы (n=21) сразу включались в программу ЭКО (ICSI). Стимулирующих курсов этим пациентам не проводилось. Результаты эффективности лечения представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Результаты лечения пациентов с бесплодием обусловленным генетическими факторами (абс., %)

Пациенты с наследственным фактором (n=21)	n, %	После 1 ICSI	После 2 ICSI
Нормозооспермия	1 (4,8%)	1 (4,8%)	1 (4,8%)
Олигозооспермия	2 (9,5%)	2 (9,5%)	2 (9,5%)
Астенозооспермия	7 (33,3%)	7 (33,3%)	7 (33,3%)
Тератозооспермия	2 (9,5%)	2 (9,5%)	2 (9,5%)
Азооспермия	9 (42,8%)	9 (42,8%)	9 (42,8%)
<b>Беременности</b>	–	<b>3 (14,2%)</b>	<b>5 (23,8%)*</b>
Примечание – * – достоверность различий между 1 и 2 контрольными точками ( $p \geq 0,05$ ).			

Согласно данным таблицы 19 выявлено, что после первого цикла ICSI удалось добиться 3 беременностей (14,2%), а после 2 цикла еще двух. Таким образом, эффективность лечения составила 23,8%. У 16 пациентов после двух циклов ВРТ добиться успеха не удалось (76,2%). Графическое представление полученных данных для количества беременностей представлено на диаграмме 9.

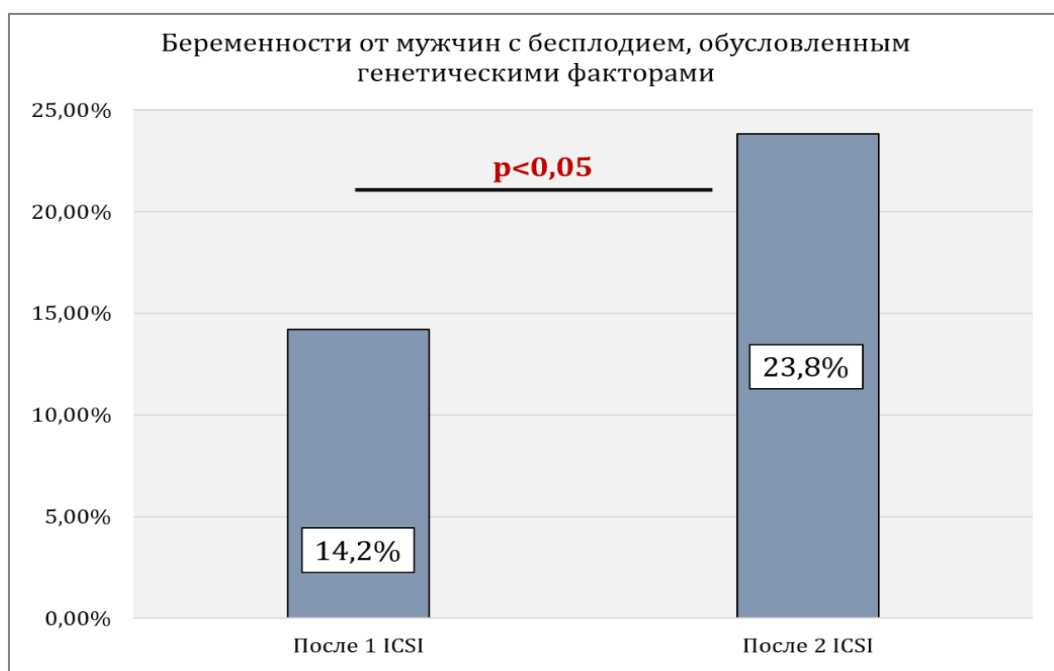


Диаграмма 9 – Количество благоприятных исходов лечения инфертильных мужчин с генетическими факторами

### 3.9 Результаты лечения инфертильности у мужчин с эндокринными факторами

Из 12 пациентов с эндокринными нарушениями 3 имели в анамнезе перенесенный крипторхизм и орхопексию (25,0%), у одного признаки гипогонадизма сопровождались атрезией семявыносящих протоков (8,3%), у одного пациента признаки гипогонадизма определялись на фоне рака предстательной железы, у 2 пациентов (16,6%) имелась пролактинома и у 5 пациентов гормональные нарушения были обусловлены наследственными синдромами (41,6%). Этим пациентам проводились коррекционные курсы, а также курс стимулирующей сперматогенез терапии. При отсутствии беременности данные пациенты в дальнейшем велись по протоколу ЭКО (ICSI) (таблица 20).

Таблица 20 – Результаты лечения пациентов с бесплодием, обусловленным эндокринными факторами (абс., %)

Пациенты с эндокринным фактором (n=12)	n, %	После лечения и стимуляции	После 1 ICSI	После 2 ICSI
Нормозооспермия	2; 16,6%	3; 25,0%	3; 25,0%	3; 25,0%
Олигозооспермия	1; 8,3%	1; 8,3%	1; 8,3%	1; 8,3%

Продолжение таблицы 20

Пациенты с эндокринным фактором (n=12)	n, %	После лечения и стимуляции	После 1 ICSI	После 2 ICSI
Астенозооспермия	4; 33,3%	3; 25,0%	3; 25,0%	3; 25,0%
Тератозооспермия	3; 25,0%	3; 25,0%	3; 25,0%	3; 25,0%
Азооспермия	2; 16,6%	2; 16,6%	2; 16,6%	2; 16,6%
<b>Количество беременностей</b>	–	–	<b>2; 16,6%</b>	<b>5; 41,6%</b>

Примечание – \* – достоверность различий между 1 и 2 контрольными точками ( $p \leq 0,05$ ); значимость различия в отношении наступления беременностей представлена на отдельном рисунке ниже.

Графическое представление полученных данных для количества беременностей представлено на диаграмме 10.

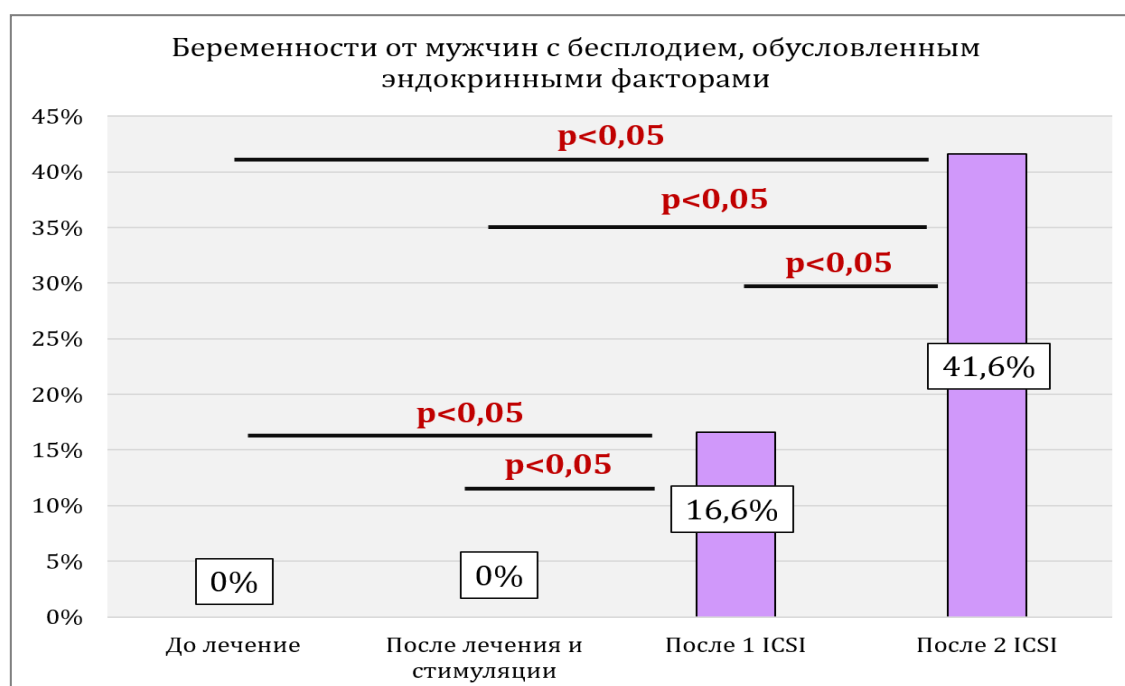


Диаграмма 10 – Количество благоприятных исходов лечения инфертильных мужчин с эндокринными факторами

Согласно полученным данным, терапия эндокринных нарушений, несмотря на некоторые улучшения сперматологической картины не привела к возникновению беременностей, поэтому все 12 пациентов были проведены по протоколу ЭКО (ICSI). После первого цикла в группе было выявлено 2 беременности (16,6%), после второго еще

3 беременности. Таким образом, суммарная эффективность лечения infertility у пациентов с эндокринными расстройствами в этой группе составила 41,6%. У 7 пар добиться беременности не удалось.

### 3.10 Результаты лечения infertility у мужчин с идиопатическим фактором

В этой группе было 96 пациентов (37,3%), причем распространенность идиопатических факторов была несколько выше, чем в когорте всех пациентов с нарушением infertility (30,02%). Этим пациентам было проведено 2 курса терапии, стимулирующей сперматогенез. Те пациенты, у которых не удалось добиться беременности с помощью консервативных стимуляционных курсов лечения, в дальнейшем велись по протоколу ЭКО (ICSI).

Результаты проведенного лечения представлены в таблице 21. Согласно данным таблицы 21 на фоне 2 курсов консервативной стимуляционной терапии удалось добиться восстановления нормальных показателей спермограммы у 21 пациента (21,8%), и получить 7 беременностей (7,3%).

Таблица 21 – Результаты лечения пациентов с бесплодием, обусловленным идиопатическим фактором (абс., %)

Пациенты с идиопатическими факторами (n=96)	n, %	После 2 курсов лечения	После 1 ICSI	После 2 ICSI
Нормозооспермия	–	21*; 21,8%	20; 20,8%	18; 18,7%
Олигозооспермия	23; 23,9%	18; 18,7%	20; 20,8%	20; 20,8%
Астенозооспермия	25; 26,0%	15; 15,6%	14; 14,6%	14; 14,6%
Тератозооспермия	33; 34,3%	27; 28,2%	27; 28,2%	29; 30,2%
Азооспермия	15; 15,6%	15; 15,6%	15; 15,6%	15; 15,6%
<b>Беременности</b>	–	<b>7; 7,3%</b>	<b>28; 29,1%</b>	<b>41; 42,7%</b>
Примечание – * – достоверность различий между 1 и 2 контрольными точками ( $p \leq 0,05$ ); значимость различия в отношении наступления беременностей представлена на отдельном рисунке ниже.				

Графическое представление полученных данных для количества беременностей представлено на диаграмме 11.



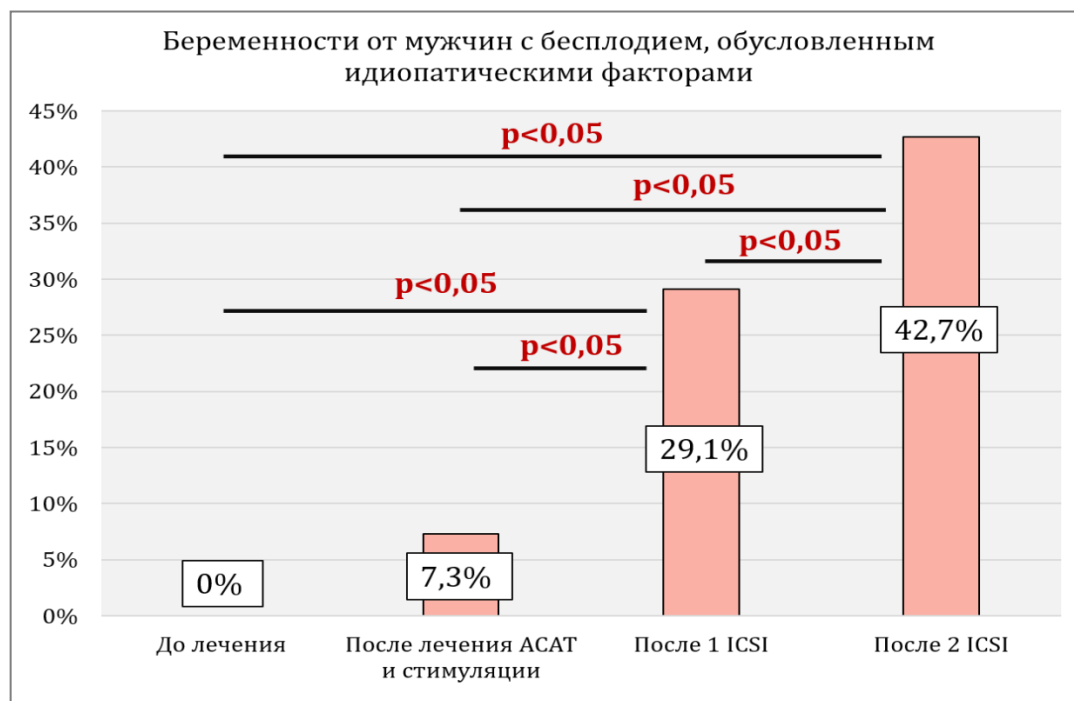


Диаграмма 11 – Количество благоприятных исходов лечения инфертильных мужчин с идиопатическим фактором

После двух полных циклов ЭКО (ICSI) удалось суммарно добиться еще 34 беременностей, что суммарно составило 42,7% случаев в исследуемой группе. Тем не менее, несмотря на проведение 2 классических курсов стимулирующей терапии и 2 полных циклов ЭКО (ICSI), у 55 пациентов (57,2%) добиться беременности не удалось.

### 3.11 Результаты лечения инфертильности у мужчин с тератозооспермией

Во всех вышеперечисленных когортах имелись пациенты с тератозооспермией. Этим пациентам проводилась стимулирующая сперматогенез терапия того или иного вида, которая иногда приводила к уменьшению количества патологических форм сперматозоидов, а также к появлению беременностей. Следует учитывать и то, что в большинстве случаев количество аномальных сперматозоидов редко превышало 99,0%, поэтому у этих пациентов были клинически значимые шансы на получение беременности при ICSI.

Общее количество пациентов с тератозооспермией во всех наблюдаемых группах составило 74 (28,7%).

Результаты проведенного лечения представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Результаты лечения пациентов с тератозооспермией (абс., %)

Пациенты с тератозооспермией (n=58)	До лечения	После специфического лечения	Нормоспермия
ИППП	23; 39,6%	22; 20%*	1; 4,34%
Хронический простатит	12; 20,6%	9; 12,3%*	3; 25,0%
Варикоцеле	10; 17,2%	8; 19,0%	2; 20,0%
Крипторхизм	2; 3,44%	2; 16,6%	0
Аномалии строения половых органов и опухоли	1; 1,72%	1; 11,1%	0
Иммунологический фактор (АСАТ и HLA конфликт)	6; 10,3%	5; 21,7%*	1; 16,6%
Генетический фактор	2; 3,44%	2; 9,5%	0
Идиопатические факторы	33; 56,9%	27; 28,2%*	6; 18,1%
<b>Всего пациентов</b>	<b>74; 100%</b>	–	13; 17,5%
<b>Беременности</b>	–	<b>5; 6,75%</b>	–

Примечание – \* – достоверность различий между 1 и 2 контрольными точками ( $p \leq 0,05$ ); значимость различия в отношении наступления беременностей представлена на отдельном рисунке ниже с учётом ICSI.

Графическое представление полученных данных для количества беременностей представлено на диаграмме 12.

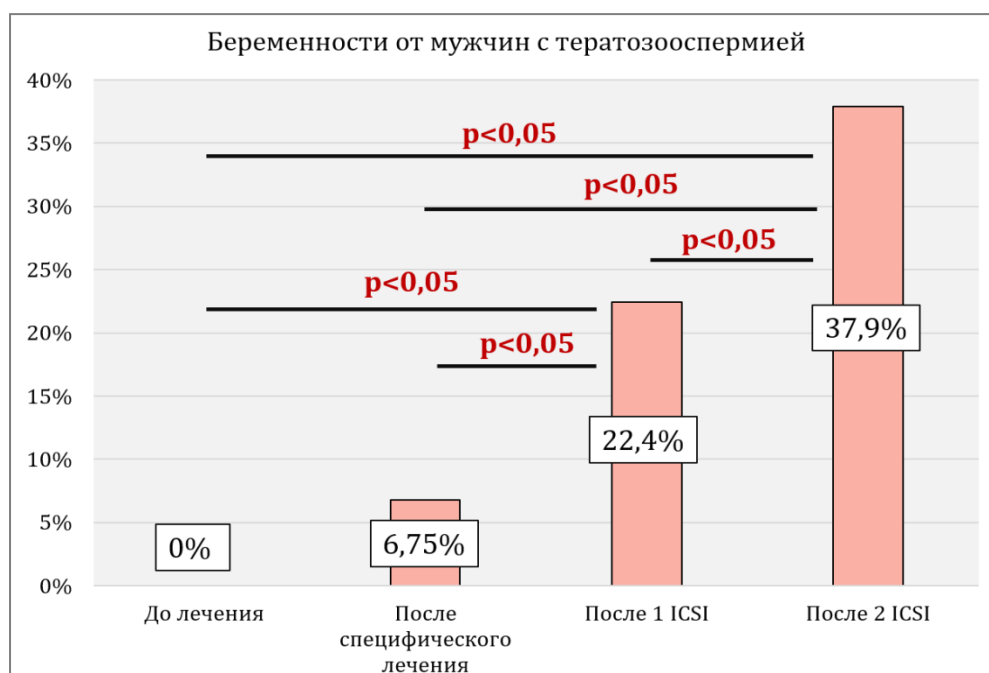


Диаграмма 12 – Количество благоприятных исходов лечения инфертильных мужчин с тератозооспермией

Из 25 мужчин с известными факторами, которые обуславливали наличие тератозооспермии, 23 (92,0%) имели ИППП, каждый пятый (20,6%) имел хронический простатит, 17,2% варикоцеле. На остальные причины в общей сложности пришлось 18,9%. Четыре пациента имели более 2 факторов infertility одновременно.

Таким образом, на основании полученных результатов (таблица 22) можно сделать вывод о том, что при тератозооспермии, особенно обусловленной наличием онкологии, иммунологическими, генетическими и аномалийными факторами (крипторхизм) эффективность стимулирующей терапии остается сравнительно невысокой и не превышает 17,56%, но у 13 пациентов она оказалась успешной, улучшила показатели спермограммы и привела к возникновению у партнерш 5 беременностей (6,75%).

Более эффективной оказалась технология ЭКО (ICSI) эффективность которой позволила добиться беременности еще в 17 случаях (29,3%) среди всех пар, где у мужчин была выявлена тератозооспермия. Всего в этой группе было получено 22 беременности (37,9%).

К сожалению, в 36 случаях (62,0%) обеспечить беременность парам с тератозооспермией, даже после двух циклов ВРТ – ЭКО (ICSI), не представилось возможным. По всей видимости, эти парам нужно либо продолжать тактику использования вспомогательных репродуктивных технологий, либо искать другой альтернативный источник лечения тератозооспермии.

### **3.12 Результаты лечения infertility у мужчин с азооспермией**

Всего во всех исследуемых группах наблюдалось 27 пациентов с азооспермией. Курсы стимулирующей терапии для активации сперматогенеза этим пациентам не проводились, так как они сразу отправлялись на TESE. Сперматозоиды, пригодные для работ по программе ВРТ были получены у 10 пациентов (37,03%), причем 2 имели фактор ИППП (7,4%), 2 – простатит (7,4%), 3 – стриктуры семявыносящих протоков различной локализации (11,1%) и у 3 из них, ранее был установлен идиопатический фактор (11,1%). Вариант секреторного бесплодия был выявлен у 14 пациентов (51,8%). Для тех пациентов, у которых сперматозоиды получить не удалось, в дальнейшем в программе ЭКО (ICSI) использовался донорский материал, что привело к возникновению и развитию беременностей в 5 случаях (18,5%). Результаты проведенного лечения указаны в таблице 23.

Следует отметить, что использование двух циклов ВРТ – ЭКО (ICSI) с донорским материалом оказалось лишь частично эффективным. При работах со сперматозоидами, полученными при микроTESE (n=10) при использовании собственного и донорского материала у пациентов с азооспермией, суммарно было получено 5 беременностей (18,5%). В 22 случаях

(81,4%) добиться беременности не удалось, по всей видимости отсутствие беременностей было связано с неизвестными и непреодолимыми причинами.

Таблица 23 – Результаты лечения пациентов с азооспермией (абс., %)

Пациенты с азооспермией (n=27)	n, %	После 1 ICSI	После 2 ICSI
ИППП	7 (6,36%)	7 (6,36%)	7 (6,36%)
Хронический простатит	3 (4,1%)	3 (4,1%)	3 (4,1%)
Варикоцеле	2 (4,7%)	2 (4,7%)	2 (4,7%)
Крипторхизм	2 (16,6%)	2 (16,6%)	2 (16,6%)
Аномалии строения половых органов и опухоли	3 (33,3%)	3 (33,3%)	3 (33,3%)
Иммунологический фактор (АСАТ и HLA конфликт)	2 (8,7%)	2 (8,7%)	2 (8,7%)
Генетический фактор	9 (42,8%)	9 (42,8%)	9 (42,8%)
Идиопатические факторы	15 (15,6%)	15 (15,6%)	15 (15,6%)
<b>Всего пациентов</b>	<b>27</b>	–	–
<b>Количество беременностей</b>		<b>2 (7,4%)</b>	<b>5*(18,5%)</b>
Примечание – * – достоверность различий между 1 и 3 контрольными точками ( $p \leq 0,05$ ).			

Графическое представление полученных данных для количества беременностей представлено на диаграмме 13.

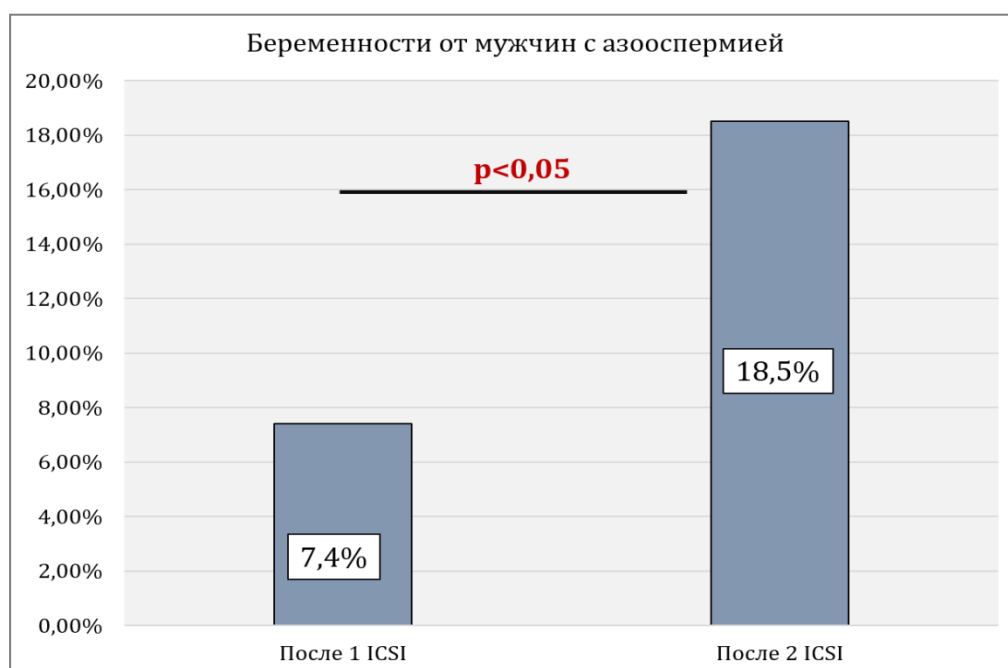


Диаграмма 13 – Количество благоприятных исходов лечения инфертильных мужчин с азооспермией

### 3.13 Итоговый анализ результатов лечения infertility

В настоящем исследовании участвовало 292 мужчин (28,8%) с известными факторами infertility и здоровыми партнерами. Эти пациенты получали различные виды лечения, о которых подробно выше. При проведении анализа эффективности лечения нас в первую очередь интересовала частота возникновения беременностей в наблюдаемых группах.

Сравнительная эффективность различных методов лечения представлена в сводной таблице 24.

Таблица 24 – 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%)**
<b>Фактическое количество беременностей</b>	–	<b>37 (12,6%)</b>	<b>78 (26,7%)*</b>	<b>134 (45,89%)**/***</b>
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 ( $p \leq 0,05$ ).				

Часть пациентов имела сразу несколько причин, которые могли приводить к инфертильности, например, аномалии развития и гипогонадизм, или варикоцеле с ИППП и хроническим простатитом и так далее. При этом 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. Абсолютное количество пациентов с инфертильностью и наличием сочетанных провоцирующих факторов представлено в таблице 25.

Таблица 25 – Результаты лечения инфертильности в зависимости от сочетания факторов мужской инфертильности (абс., %)

Параметры	n, %	Факторы бесплодия		
		1 фактор	2 фактора	более 2-х факторов
Всего (пациентов)	<b>292</b>	88* (30,1%)	94** (32,1%)	110*** (37,6%)
Восстановление нормоспермии	<b>126 (43,1%)</b>	83* (94,3%)	28** (29,7%)	15*** (13,6%)
Беременности после стимуляции	<b>37 (12,6%)</b>	30* (34,0%)	6** (6,38%)	1*** (0,9%)
Беременности после двух циклов ЭКО	<b>134 (45,89%)</b>	74* (84,09%)	53** (56,3%)	7*** (6,36%)
Неудачи лечения	<b>158 (54,1%)</b>	<b>14* (15,9%)</b>	<b>41** (43,6%)</b>	<b>103*** (93,6%)</b>
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 ( $p \leq 0,05$ ).				

Таким образом, согласно данным таблиц 24 и 25 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 об 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 (45,89%) у супружеских пар в исследуемых группах, инфертильных по мужскому фактору, а эффективность 1 попытки ЭКО

(ICSI) в среднем составила 21,08%, что является средним показателем для 1 попытки лечения бесплодия пар инфертильных по мужскому фактору.

Тем не менее, несмотря на общую эффективность восстановления сперматогенеза, фертильности и появления беременностей во всех группах остались пациенты, у которых проводимая терапия оказалась неэффективной.

Согласно таблице 25 таких пациентов оказалось 158 (54,1%). В этих парах, несмотря на наличие здоровых партнерш, добиться беременности, после курсов патогенетического лечения, курсов, стимулирующих сперматогенез и двух полных циклов ЭКО (ICSI) не удалось.

Таким образом, у каждого второго пациента (54,1%) с мужским бесплодием современное высокотехнологичное и дорогостоящее лечение оказалось неэффективным.

Все случаи неудачного лечения мужской инфертильности в исследуемых когортах представлены на диаграмме 14.

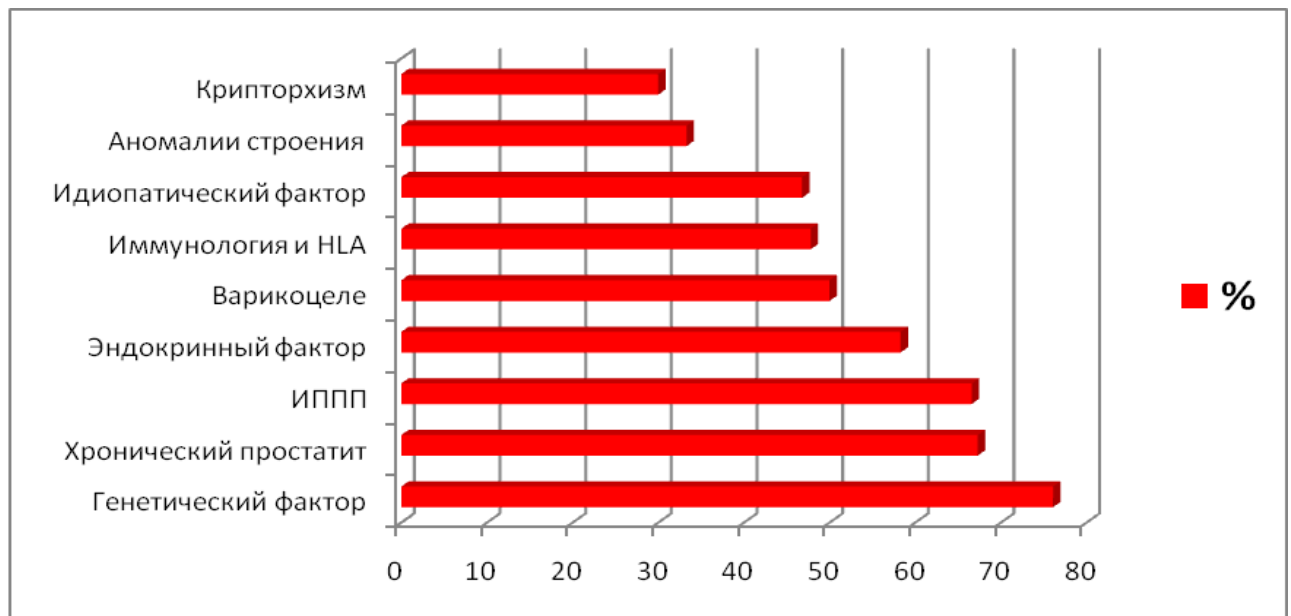


Диаграмма 14 – Неудачные результаты терапии в исследуемых когортах (абс., %)

Согласно полученным данным, наибольшее количество неудач приходится на когорты больных с генетическими и воспалительными факторами ( $\geq 60,0\%$ ). Интересно, что, 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.

Риск неудачи у большинства пациентов варикоцеле, иммунными факторами, у пациентов с идиопатическими формами, а также с эндокринными расстройствами, особенно

при одновременном сочетании нескольких факторов, провоцирующих инфертильность составляет 46,8-58,3%. У пациентов с крипторхизмом и другими аномалиями строения органов репродуктивной системы риск неудач составляет 30-33,3%.

Варианты нарушений сперматогенеза у пациентов с неудачами, представлена в таблице 26.

Таблица 26 – Анализ неудачных результатов терапии пациентов с мужским фактором (абс., %)

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

Согласно данным таблицы 26 у пациентов с нормальной спермиологической картиной, на фоне лечения сопутствующих заболеваний, общее количество неудач при лечении составило в среднем 10,25%.

Таким образом, чем более выраженные нарушения сперматогенеза у пациентов, тем выше риски неудачного лечения инфертильности у мужчин, причем в вариантах олигозооспермии и астенозооспермии количество неудач в среднем составляет 50-54,2%. При тератозооспермии вероятность неудачи составляла 70,2%, при азооспермии – 81,4%.

### 3.14 Заключение

После проведения классической стимулирующей терапии и двух полных циклов ЭКО (ICSI), было выявлено, наступление беременностей у 134 из 292 обследуемых пар с определяющим мужским фактором бесплодия (45,8%), что является хорошим результатом проводимого лечения. Тем не менее, согласно данным, указанным в разделах 2.1-2.10 выявлено, что в 158 случаях (54,1%) добиться беременностей в паре не удалось. При этом консервативная стимулирующая терапия показала свою эффективность, результатом которой явилась нормоспермия в 126 случаях (43,1%), и это привело к возникновению 37 беременностей



(12,6%). Проведение 2 полных циклов вспомогательных репродуктивных технологий, включающих ЭКО (ICSI), позволило добиться еще 97 беременностей (всего 45,9%), причем эффективность 1 попытки составила в среднем 21,08%, что является средним показателем для 1 попытки лечения бесплодия пар, инфертильных по мужскому фактору.

Анализируя полученную информацию, выявлено, что у пациентов инфертильных по 1 фактору, достичь нормоспермии удалось в 94,3%, по 2 факторам всего в 29,7%, при наличии более двух факторов в 13,6%. С учетом того, что использование вспомогательных репродуктивных технологий также не является гарантией получения беременности в супружеской паре, а одна попытка эффективна в среднем в 21,08% случаев, у мужчин, бесплодных по 1 фактору, общая частота неудач статистически достоверно составила 15,9%, по 2 факторам 43,6%, при наличии более двух факторов – 93,6%.

Частота получения беременностей на фоне лечения, у мужчин бесплодных по 1 фактору статистически достоверно составила 84,09% по 2 факторам – 56,3% и у пациентов, имеющих более 2 факторов – 6,36% (таблица 26). Таким образом, чем больше имеется у пациентов провоцирующих факторов одновременно, тем меньше шансов на нормальное восстановление сперматогенеза и более низкая вероятность наступления беременности в паре, бесплодной по мужскому фактору. К категориям пациентов, у которых риски ненаступления беременности достаточно высоки, относятся мужчины, бесплодные по генетическому фактору, или имеющие воспалительные заболевания репродуктивного тракта, в том числе ИППП (хламидии, уреаплазмы), причем частота неудач у них составляет более 60%. При наличии варикоцеле, иммунологических факторов и эндокринных расстройств, особенно при одновременном сочетании двух и более провоцирующих факторов, отсутствие беременностей наблюдается в 46,8-58,3% случаев. При наличии у пациентов аномалий развития и строения органов репродуктивной системы, включая крипторхизм, частота неудач составляет – 30,0-33,3%.

У 196 пациентов с известными провоцирующими факторами, удалось добиться беременности в 113 случаях (57,7%), а у 96 пациентов с идиопатическим фактором – в 42,7% случаев. Это свидетельствует, что, несмотря на значительное влияние сопутствующих заболеваний на вероятность успешного зачатия, лечение известных факторов чаще приводит к успешному финалу, чем в лечение идиопатической формы мужского бесплодия.

При когортном анализе выявлено, что у пациентов с нормальной спермиологической картиной, на фоне лечения сопутствующих заболеваний, число неудачных исходов не превышало 10,25%. При олигозооспермии – 54,2%, при астенозооспермии, количество неудач в среднем составляет 50,0%, при тератозооспермии – 70,2%, а при азооспермии – 81,4%. Таким образом, при лечении нарушений сперматогенеза, наиболее неблагоприятный исход лечения при тератозооспермии и азооспермии, при этом общее число беременностей у этих категорий

пациентов составило 27 (31,7%). Кроме того, получить беременность при олигоспермии, почти в 2 раза сложнее чем ситуация, когда имеется только фактор астенизации сперматозоидов.

У 120 пациентов с наличием ИППП (41,09%) после лечения специфических инфекций и проведения 2 стимулирующих курсов была достигнута нормализация спермиологической картины у 23 пациентов (20,7%), при этом было зафиксировано 13 беременностей (10,08%). После двух циклов ВРТ (ЭКО-ICSI) было выявлено еще 27 беременностей (24,5%). Таким образом, общее количество беременностей в данной группе составило 40 (33,3%), причем наилучших результатов удалось получить у пациентов с олигозооспермией и астенозооспермией, которые составили 97,5% всех удачных исходов в этой группе.

У пациентов с хроническим простатитом после курсов лечения простатита и нарушений сперматогенеза выявлено, что нормализация спермограмм наступила у 48,3% пациентов, на фоне которой было зафиксировано 9 беременностей (9,18%). После проведения двух полных циклов ЭКО-ICSI в этой когорте было выявлено еще 23 беременности. В целом в этой группе было выявлено 32 беременности, что составляет 32,6%.

У пациентов после лечения варикоцеле и проведения реабилитационного курса в течение 6 месяцев было выявлено, что спермограмма нормализовалась у 17 пациентов (23,2%). При этом выявлено 7 беременностей (16,6%), число которых увеличилось после двух циклов ЭКО (ICSI) до 21 (50,0%). Таким образом, перевязка тестикулярных вен и реабилитационные послеоперационные курсы позволили добиться успеха в 50,0% случаев. Наиболее эффективным данное лечение оказалось у пациентов с астенозооспермией и олигозооспермией, где на данные группы пришлось суммарно 85,7% благоприятных исходов лечения.

У пациентов с крипторхизмом стимулирующая терапия привела к восстановлению нормальных показателей сперматогенеза у 3 пациентов (30,0%) и появлению 2 беременностей (20,0%). С помощью вспомогательных репродуктивных технологий удалось добиться появления беременностей еще у 5 пар, таким образом, общая эффективность лечения infertility у пациентов с крипторхизмом составила 70,0%.

У пациентов с аномалиями и опухолями репродуктивной системы после двух циклов ЭКО (ICSI) удалось добиться наступления 6 беременностей, таким образом, эффективность лечения в данной когорте составила 66,6%, с учетом того, пациенты этой когорты сразу были определены на ВРТ.

В когорте пациентов с иммунологическим фактором, после проведения специальной терапии было выявлено, что у 4 пациентов спермиологическая картина восстановилась до нормоспермии (17,4%), что привело к появлению 2 беременностей (8,7%), и к еще 10 беременностям после 2 полных циклов ЭКО. Таким образом, общая клиническая эффективность в этой когорте составила 52,1%. Для сравнения, в когорте пациентов

с генетическими нарушениями эффективность составила – 23,8%, в когорте с эндокринными факторами – 41,6%.

Таким образом, следует отметить, что основными причинами неудач в исследуемых когортах можно признать нарушения сперматогенеза: на уровне азооспермии (до 81,4%), тератозооспермии (до 71,2%), при одновременном наличии нескольких угнетающих сперматогенез факторов (до 93,6%), а также при наличии генетических и иммунологических факторов и воспалительных повреждений органов репродуктивной системы, в том числе при наличии ИППП (повышение риска неудачи до 66,6-76,1%). В остальных случаях лечение инфертильности было сравнительно успешным.

В заключение следует отметить, что несмотря на проведение того или иного вида специального лечения, двух курсов терапии, стимулирующей сперматогенез, и двух полных циклов ЭКО (ICSI) в 158 случаях (54,1%) добиться наступления беременности в обследуемых парах не удалось. Этим пациентам, по всей видимости, нужно либо продолжать дальнейшее участие в программах ЭКО, но, сколько еще потребуется попыток для успешного наступления беременности неизвестно. Либо им нужно предлагать другие альтернативные методы лечения, в частности, терапию обогащенными клеточными культурами с факторами роста или матричный клеточный прайтинг.

## Глава 4

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ КУЛЬТУРАМИ,  
ОБОГАЩЕННЫМИ СТВОЛОВЫМИ / ПРОГЕНИТОРНЫМИ КЛЕТКАМИ  
КСЕНОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

**4.1 Популяционные характеристики экспериментальных животных**

Всего для исследования особенностей влияния экспериментальной терапии культурами, обогащенными стволовыми / прогениторными клетками в ксеноварианте использовались 80 половозрелых крыс самцов породной группы Wistar и 30 половозрелых самок для контроля фертильности. Все крысы самцы участвующие в эксперименте изначально были фертильными. Для контроля использовалась небольшая группа животных (крысы Wistar, n=10).

**4.2 Характериологические особенности клеточных культур,  
обогащенных ксеногенными стволовыми и прогениторными клетками**

Для оценки эффективности терапии обогащенными клеточными культурами в ксеноварианте были использованы следующие культуры, представленные в таблице 27.

Таблица 27 – Характеристика культур, обогащенных стволовыми / прогениторными клетками в ксеноварианте

№	Название ксеногенной культуры	Дозы	Витальность культуры (по трипановому синему)	Количество животных в группе	Количество операций
1	Культура человеческих мезенхимальных клеток	500000 ЕД в 1 и 2 яичка	96-98%	10	32
2	Культура человеческих клеток фетального яичка	500000 ЕД в 1 и 2 яичка	96-98%	10	32
3	Культура клеток человеческого костного мозга	500000 ЕД в 1 и 2 яичка	96-98%	10	32

Продолжение таблицы 27

№	Название ксеногенной культуры	Дозы	Витальность культуры (по трипановому синему)	Количество животных в группе	Количество операций
4	Культура клеток плаценты человека	500000 ЕД, 50000 ЕД, 5000 ЕД	92-97%	15	52
5	Культура клеток пуповины человека	500000 ЕД, 50000 ЕД, 5000 ЕД	92-97%	15	52
6	Культура клеток яичка мышей линии C-57 Black/6, несущих ген GFP	50000 ЕД, 5000 ЕД	92-97%	10	32
7	Культура клеток висцеральной жировой ткани мышей линии C-57 Black/6, несущих ген GFP	500000 ЕД, 50000 ЕД,	92-97%	10	32

Таким образом, для оценки эффективности ксеногенного варианта терапии было использовано 7 групп экспериментальных животных (беспородных крыс Wistar). При этом животным моделировался абдоминальный двухсторонний крипторхизм по Дендеберову-Кирпатовскому, затем через 3 недели экспозиции животным оперативным способом под белочную оболочку вводилась клеточная культура соответствующего вида и объема.

В каждой группе было выделено по 4 животных, которые после пересадки находились под наблюдением для оценки фертильности, которых держали отдельно и сажали в клетки к самкам.

#### 4.3 Результаты исследований гормонов крови в экспериментальных группах

Для оценки изменений гормонального профиля использовались измерения концентраций общего тестостерона, гонадотропных гормонов (ФСГ и ЛГ) и уровень Ингибина Б. При этом было отмечено, что во всех группах к 21 суткам отмечалось снижение базовых концентраций общего тестостерона больше чем на 50%, при этом разброс суммарных значений для каждого показателя был статистически достоверным ( $p=0,003$ ) (диаграмма 15).

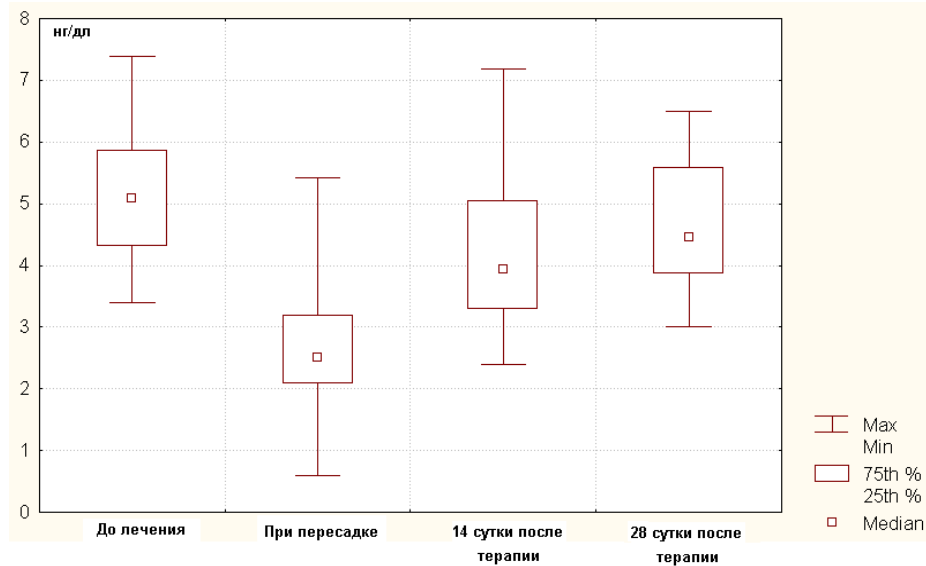


Диаграмма 15 – Изменения динамики общего тестостерона в группах ксеноварианта (приведены средние значения)

Для гонадотропных гормонов сыворотки крови (ФСГ и ЛГ) было зафиксировано некоторое компенсаторное повышение уровня к 21 суткам экспозиции яичек в брюшной полости, которое затем снизилось до исходных значений, но изменения были статистически недостоверны ( $p=0,074$ , для ФСГ и  $p=0,69$  для ЛГ) из-за большого количества разбросов, поэтому графические иллюстрации мы не приводим.

К 21 суткам отмечены изменения уровня половых гормонов, характерных для гипергонадотропного гипогонадизма, который бывает при крипторхизме. Данные результаты подтверждают выводы, полученные нами в более ранних работах.

Результаты исследования уровня Ингибина Б в этих группах показаны на диаграмме 16.

В результате повреждения тканей яичка при двухстороннем абдоминальном крипторхизме отмечалось достоверное выраженное снижение средних значений ингибина Б во всех группах к 21 суткам наблюдения. Восстановление уровня ингибина Б до первоначального уровня отмечалось только к 90 суткам.

С учетом восстановления сперматогенеза у экспериментальных животных, который восстанавливался до зрелых форм не ранее 72 суток, можно отметить, что уровень ингибина Б тесно коррелирует с состоянием сперматогенного эпителия семенных канальцев, а восстановление функции сперматогенного эпителия идет более медленно, коррелируя с герминогенной функцией яичек и уровнем общего тестостерона, который восстанавливается до нормальных значений уже к 14 суткам.

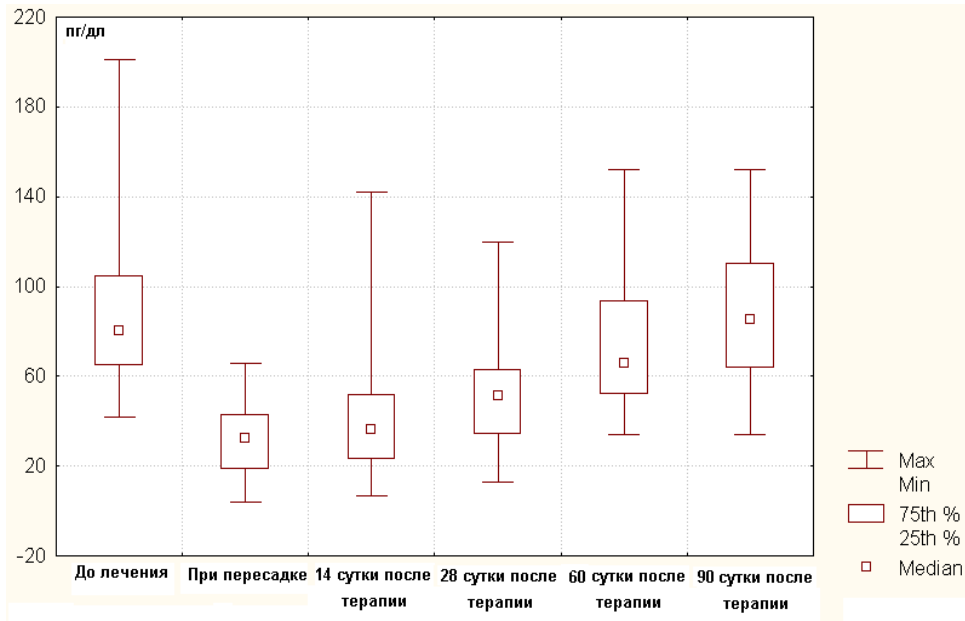


Диаграмма 16 – Изменения динамики Ингибина Б в группах ксеноварианта (приведены средние значения)

Таким образом, после экспериментальной терапии нарушений функции яичек, гормональный дисбаланс, характерный для гипергонадотропного гипогонадизма восстанавливается уже к 14 суткам, а функция сперматогенного эпителия восстанавливалась не ранее 72 суток, что косвенно подтверждается изменением концентрации ингибина Б, которая восстанавливается до исходных значений не ранее 90 суток наблюдения.

#### 4.4 Морфологические исследования тканей яичек в группах ксеноварианта

По данным проведенного морфологического исследования тканей яичек у крыс к 21 суткам в биоптатах наблюдаются следующие изменения, представленные на рисунке 9: практически 100% канальцев лишены признаков сперматогенеза до конечных форм (А, В). В большинстве из них определяются клетки Сертоли (D) и единичные элементы дифференцировки стволовых клеток (F). В части канальцев отмечается потеря клеток Сертоли в отдельных локусах, вследствие чего канальцы спадаются, и признаков начального сперматогенеза в них нет (B). В отдельных канальцах отмечается десквамация росткового слоя (C). В межканальцевых локусах отмечается умеренная лимфоцитарная инфильтрация (E). Тем не менее, ряд канальцев сохраняют отдельные элементы сперматогенеза и отдельные локусы с направленной дифференцировкой (F).

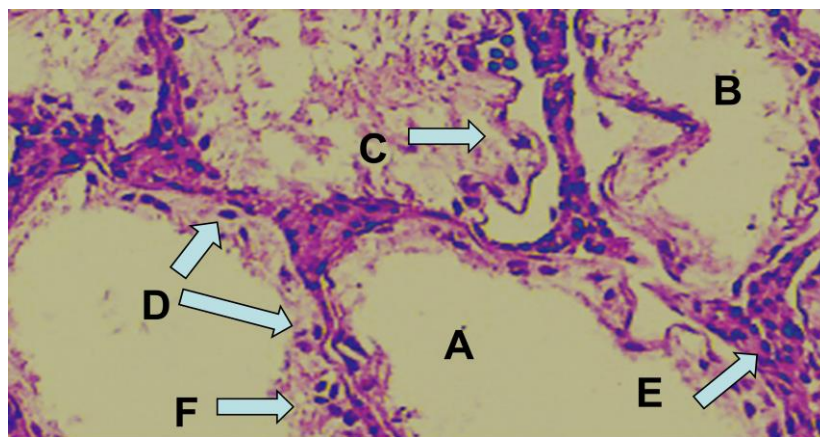


Рисунок 9 – Изменения характерные для 21 дня экспозиции абдоминального криптохизма  
(×200)

После использования культур, обогащенными стволовыми / прогениторными клетками в ксеноварианте (рисунок 10), к 90 суткам было отмечено, что большинство канальцев имеет признаки сперматогенеза (G,H), причем в отдельных канальцах он определяется до конечных форм (H), но в тех локусах, которые утратили клетки Сертоли, даже к 90 суткам, признаков прогениторной дифференцировки не выявлено (M). В отдельных межканальцевых локусах сохраняется умеренной выраженности лимфоцитарная инфильтрация (K).

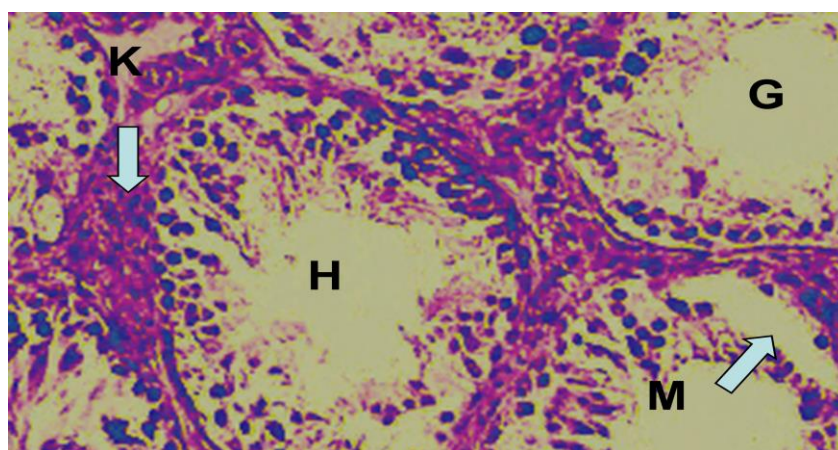
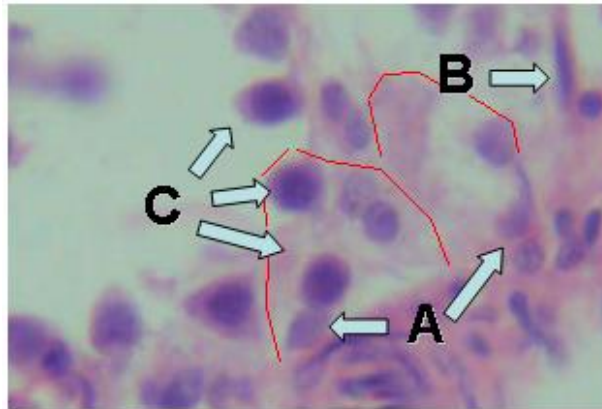


Рисунок 10 – Изменения характерные для 90 суток  
после использования терапии клеточными культурами (×200)

Таким образом, моделирование двухстороннего абдоминального крипторхизма в течение 21 суток приводит к подтвержденной утрате сперматогенеза во всех канальцах. В большинстве из них сохраняются признаки частичной прогениторной дифференцировки, что может служить основой для репаративных процессов после терапии обогащенными

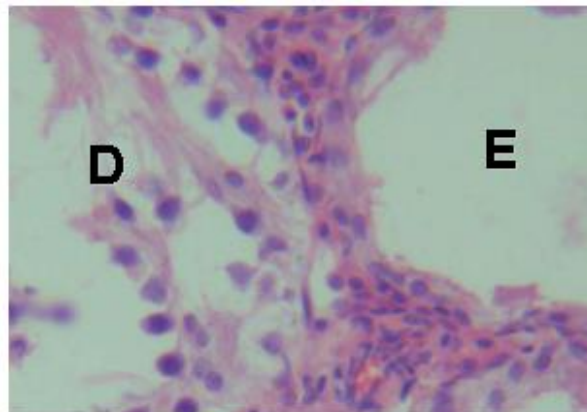


клеточными культурами, но те семенные каналцы, которые имеют частичное повреждение клеток Сертоли, даже к 90 суткам не имеют признаков сперматогенеза, несмотря на наличие свободной клеточной ниши (рисунки 11, 12).



А – клетки Сертоли (красным цветом выделены границы клеток);  
В – базальная мембрана; С – элементы прогениторной дифференцировки;

Рисунок 11 – Клетки Сертоли и прогениторная дифференцировка (90 сутки,  $\times 420$ )



D – семенной каналец с прогениторной дифференцировкой;  
E – семенной каналец с признаками частичного повреждения клеток Сертоли.

Рисунок 12 – Канальцы, имеющие повреждение клеток Сертолии каналцы с сохранными клетками (90 сутки,  $\times 200$ )

Следует отметить, что даже при наличии серьезных повреждений сперматогенного эпителия и практически полной утратой прогениторной дифференцировки, сохраняется возможность успешной репарации в некоторых каналцах и после терапии клеточными культурами, в семенных каналцах экспериментальных животных к 90 суткам мы можем наблюдать дифференцировку до конечных форм.

#### 4.5 Изменения популяции клеток Лейдига

Ранее мы отмечали, что при гипергонадотропном гипогонадизме, возникшем при моделировании абдоминального двухстороннего крипторхизма, имеется значительное снижение андрогенпродуцирующей функции клеток Лейдига [14], причем их количество может компенсаторно увеличиваться. Через 3 недели абдоминальной экспозиции клетки Лейдига имеют признаки функционального напряжения (меньшую «исчерченность», меньшее число хромаффинных гранул) и их количество увеличено, как представлено на рисунках 13, 14.

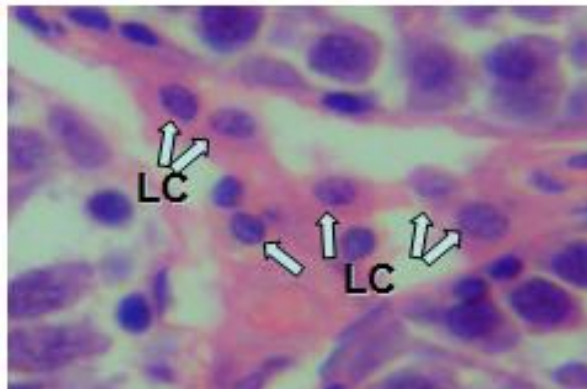


Рисунок 13 – Клетки Лейдига (LC) в норме ( $\times 420$ )

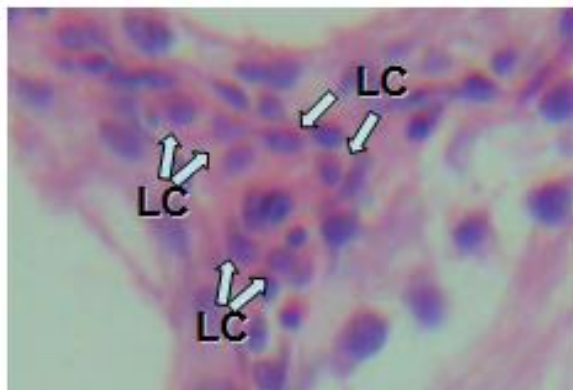


Рисунок 14 – Клетки Лейдига (LC) на 21 сутки после абдоминальной экспозиции ( $\times 200$ )

При этом выявлено, что, несмотря на успешное восстановление герминогенной функции яичек у крыс Wistar уже к 14 суткам, признаки функционального напряжения популяции клеток Лейдига сохраняются до 90 контрольных суток и это характерно для всех групп животных участвующих в эксперименте. Связано это, скорее всего, с какими – либо аутоиммунными факторами, так как в отдельных локусах сохраняется интенсивная лимфоцитарная

инфильтрация. Данные гистологических изменений межканальцевых локусов у крыс на 90 сутки наблюдения представлены на рисунках 15, 16.

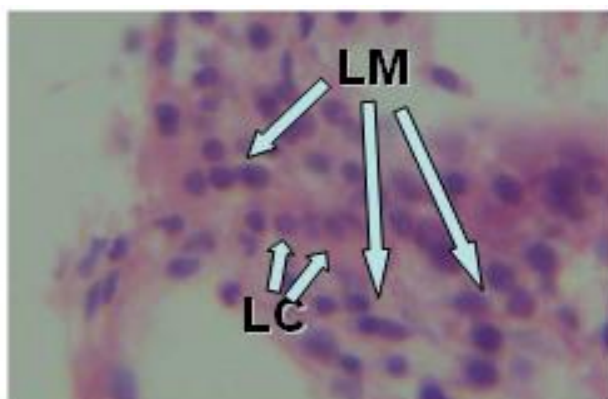


Рисунок 15 – Клетки Лейдига (LC) в условиях лимфоцитарной инфильтрации (LM), (×200)

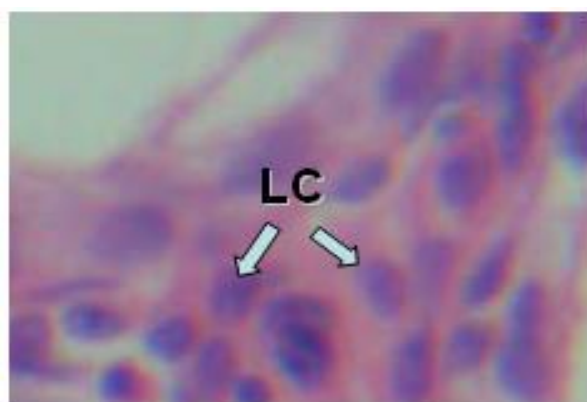


Рисунок 16 – Состояние клеток Лейдига (LC) на 90 сутки после экспериментальной терапии (×420)

Подобные изменения были характерны для всех групп ксеноварианта. Существенных отличий между группами, в зависимости от вида и состава культуры, а также видовых особенностей донора нам выявить не удалось.

#### 4.6 Исследование индекса сперматогенеза по Астраханцеву–Соловьеву

Интенсивность репарационных изменений при восстановлении сперматогенеза оценивалась по методу Астраханцева–Соловьева. В каждой группе было выделено 6 животных,

у которых после выполнения орхфуникулэктомии и изготовления гистологических препаратов, производился подсчет суспенциозитов по отношению к количеству клеток Сертоли, в 30 строго поперечных срезах семенных канальцев в сроки на 14, 28, 60, 90 и 120 сутки после терапии культурами обогащенными стволовыми и прогениторными клетками. Использовались данные билатерального варианта клеточной терапии.

Результаты исследования индекса представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Исследования индекса сперматогенеза у животных экспериментальных групп в ксеноварианте

Название культуры	14 сутки	28 сутки	60 сутки	90 сутки	120 сутки
Культура человеческих мезенхимальных клеток	1,0±0,97 (p=0,07)	0,94±0,22 (p=0,05)	0,42±0,24 (p=0,02)	0,22±0,16 (p=0,65)	0,20±0,09 (p=0,01)
Культура человеческих клеток фетального яичка	1,2±0,85 (p=0,05)	0,34±0,26 (p=0,08)	0,32±0,25 (p=0,03)	0,28±0,19 (p=0,01)	0,23±0,1 (p=0,05)
Культура клеток человеческого костного мозга	1,1±0,44 (p=0,13)	0,84±0,57 (p=0,04)	0,72±0,84 (p=0,02)	0,35±0,16 (p=0,05)	0,27±0,09 (p=0,07)
Культура клеток плаценты человека	0,96±0,9 (p=0,01)	0,44±0,23 (p=0,01)	0,42±0,14 (p=0,00)	0,25±0,13 (p=0,03)	0,24±0,07 (p=0,01)
Культура клеток пуповины человека	0,8±0,58 (p=0,05)	0,66±0,42 (p=0,07)	0,65±0,23 (p=0,02)	0,51±0,07 (p=0,06)	0,20±0,1 (p=0,08)
Культура клеток яичка мышей линии C-57 Black/6, несущих ген GFP	1,2±0,92 (p=0,24)	0,9±0,52 (p=0,04)	0,32±0,21 (p=0,22)	0,28±0,19 (p=0,07)	0,23±0,09 (p=0,08)
Культура клеток висцеральной жировой ткани мышей линии C-57 Black/6, несущих ген GFP	1,1±0,36 (p=0,33)	0,88±0,82 (p=0,07)	0,66±0,14 (p=0,3)	0,42±0,11 (p=0,033)	0,24±0,15 (p=0,032)
Контроль (фантомные операции)	1,2±0,8 (p=0,756)	1,0±0,9 (p=0,338)	0,94±0,11 (p=0,462)	0,95±0,73 (p=0,333)	0,92±0,13 (p=0,119)

Было выявлено, что у всех групп животных, за исключением тех, которые участвовали в исследовании фертильности и изначально в гистологических исследованиях участия не принимали, восстановление сперматогенеза шло с различной интенсивностью, но примерно равными темпами. Прямых корреляций между видовым составом культуры и интенсивности репарации, а также качественным составом сперматогенеза у животных выявлено не было.

Во всех клинических группах отмечалось снижение индекса сперматогенеза, что свидетельствует о хороших репаративных возможностях местных тканей яичка, на фоне эффектов экспериментальной терапии.

Также следует отметить, что динамика изменений индекса сперматогенеза в группах отражает в основном количественные и качественные аспекты восстановления сперматогенеза, но при этом не коррелирует с показателем фертильности, данные изучения которой представлены ниже.

Наименее выдающиеся результаты были получены в группе животных, перенесших терапию «микст» – культурой клеток костного мозга. В этой группе удалось получить только 1 беременность у 12 самок, соответственно коэффициент фертильности составил 0,75.

В среднем, в группах ксеноварианта, частота возникновения беременностей составила 33,27% (диаграмма 17).

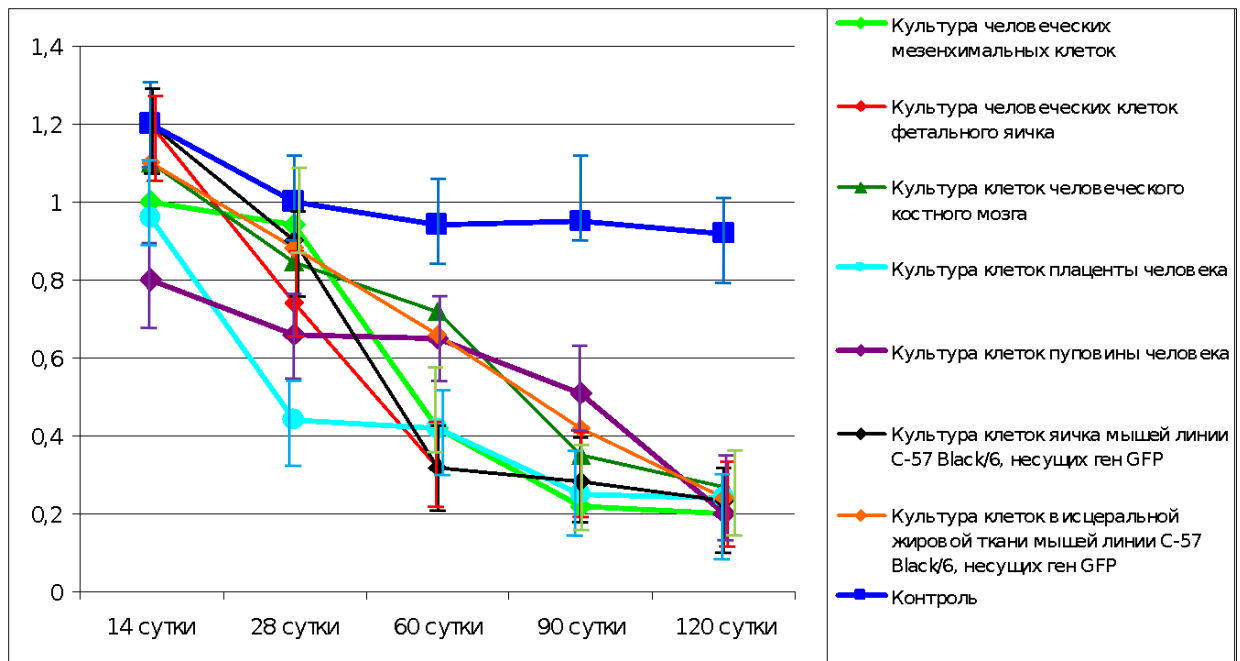


Диаграмма 17 – Исследования индекса сперматогенеза у животных экспериментальных групп в ксеноварианте

#### 4.7 Исследование фертильности экспериментальных животных

При исследовании фертильности в группах ксеноварианта было отмечено появление здоровых новорожденных во всех группах. Тем не менее, их число было значительно меньше, чем у здоровых животных. Полученные данные представлены в таблице 29:

Таблица 29 – Исследование фертильности у животных, перенесших терапию в ксеноварианте

№	Название группы	Кол-во самок (1:3)	Количество беременностей в группе (абс./%)	Среднее число крысят в помете	Коэффициент фертильности в группе на 1 самца
1	Культура человеческих мезенхимальных клеток	12	1,0/8,33%	3,0	0,75
2	Культура человеческих клеток фетального яичка	12	7,0/58,0%	2,71±1,1	4,74
3	Культура клеток человеческого костного мозга	12	5,0/41,66%	2,2±1,3	2,75
4	Культура клеток плаценты человека	12	3,0/25,0%	2,66±0,57	1,99
5	Культура клеток пуповины человека	12	5,0/41,66%	3,2±1,3	4,0
6	Культура клеток яичка мышей линии C-57 Black/6, несущих ген GFP	12	4,0/33,3%	2,75±0,5	2,75
7	Культура клеток висцеральной жировой ткани мышей линии C-57 Black/6, несущих ген GFP	12	3,0/25,0%	2,33±0,57	1,74
8	Контроль (фантомные операции)	12	0,0	0,0	0,0

Наиболее эффективным было восстановление сперматогенеза у группы животных, получавших в качестве терапии культуру клеток фетального яичка человека, причем коэффициент фертильности в этой группе был самым высоким – 4,74, а общее число беременностей в группе составило 58%.

Интересно, что во всех группах среднее число новорожденных крысят составило 2,69±0,64 новорожденных в одном помете, то время как у стандартной крысы в помете рождается не меньше 7,0 детенышей, что свидетельствует о том, что после клеточной терапии животные, давшие потомство, могут считаться фертильными, но их репродуктивный потенциал значительно снижен, не менее, чем в 2,5 раза, по сравнению со здоровыми животными.

Полученные результаты следует признать успешными, так как в группе контроля ни одной беременности получено не было.

#### **4.8 Иммуногистохимический маркерный анализ групп ксеноварианта**

Для контроля за репаративными процессами в клеточной терапии в ксеноварианте, использовались специфичные антительные маркеры, представленные в таблице 6, для оценки процессов, трансформации, стволовой дифференцировки, прогениторной дифференцировки, а также маркеры стволовости, межклеточного контактного взаимодействия и пролиферации.

##### ***4.8.1 Иммуногистохимическая характеристика тканей реципиента после ксеногенной терапии культурами, обогащенными стволовыми / прогениторными клетками***

Для оценки эффективности терапии в ксеноварианте использовались культуры различных видов, показавших сходные результаты восстановления уровня гормонов крови, сперматогенеза и фертильности, вне зависимости от видовой принадлежности донора и вида клеточных культур. Выживаемость культур на момент введения под белочную оболочку, при окраске трипановым синим и витальным красителем составила, согласно таблице 27 – 92-98%.

##### ***4.8.2 Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс на ранних сроках (до 28 дня наблюдения)***

Для удобства иммуноморфологической оценки репаративных изменений в раннем послеоперационном периоде, мы использовали ряд специфических антительных красителей, которые позволяли одновременно оценить возможность активности стволовых и прогениторных клеток (маркер Oct-4), активность клеточной трансформации (маркер Dazl), активность клеточной дифференцировки (маркеры Stella или DDX) и активность прогениторной пролиферации (маркеры BrdU или N-кадгерин). Результаты данной оценки представлены на рисунке 17.

По данным комбинированного маркерного анализа выявлено, что на ранних стадиях после терапии обогащенными клеточными культурами, начинается репаративная активность в стенках семенных канальцев, при этом хорошо видна активность ССК, которые начинают прогениторную трансформацию и пролиферацию. Активность такой трансформации хорошо

видна при окраске Dazl. Тем не менее, активность клеточной пролиферации не везде одинакова, в частности при окраске моноклональными антителами к маркеру Stella хорошо видно, что только отдельные каналы демонстрируют высокую пролиферативную активность, гораздо чаще встречаются каналы с неактивной пролиферацией.

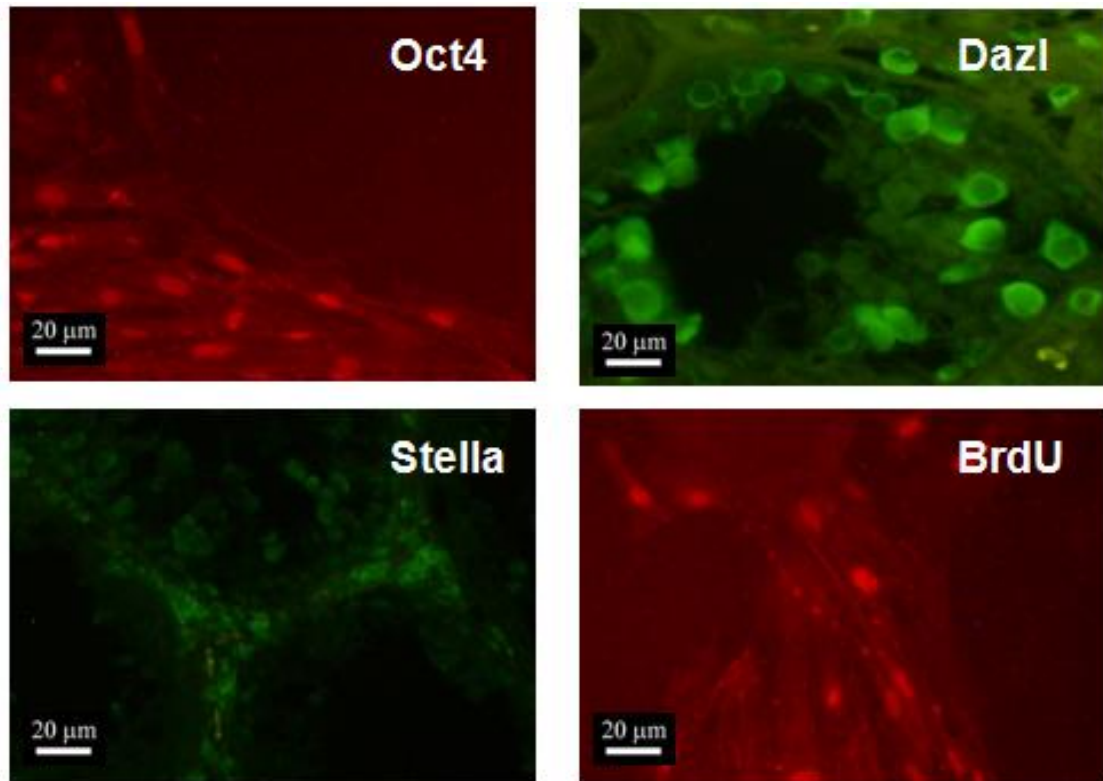


Рисунок 17 – Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс на ранних сроках,  $\times 800$

Тем не менее, те каналы, в которых активирован процесс прогениторной дифференцировки, демонстрируют активную прогениторную пролиферацию (окраска антителами к BrdU), что коррелирует с данными гистологической картины семенников крыс, индексами сперматогенеза и уровнем половых гормонов.

#### ***4.8.3 Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс на поздних сроках (90-120 дни наблюдения)***

По данным проведенных исследований на поздних сроках (90-120 суток после экспериментальной терапии в ксеноварианте) была зафиксирована выраженная прогениторная клеточная трансформация (Dazl), причем активность ССК у крыс остается, в эти сроки, весьма



высокой, и подтверждается свечением антител, окрашенных к маркерам Oct-4 и ядерному красителю Хехст 3344. Активность прогениторной дифференцировки (Stella и DDX) и сперматогенной пролиферации также остается очень высокой, и подтверждается окраской антителами к N-кадгерину.

На более поздних сроках наблюдения данные иммуногистохимических исследований препаратов семенников экспериментальных животных представлены на рисунке 18.

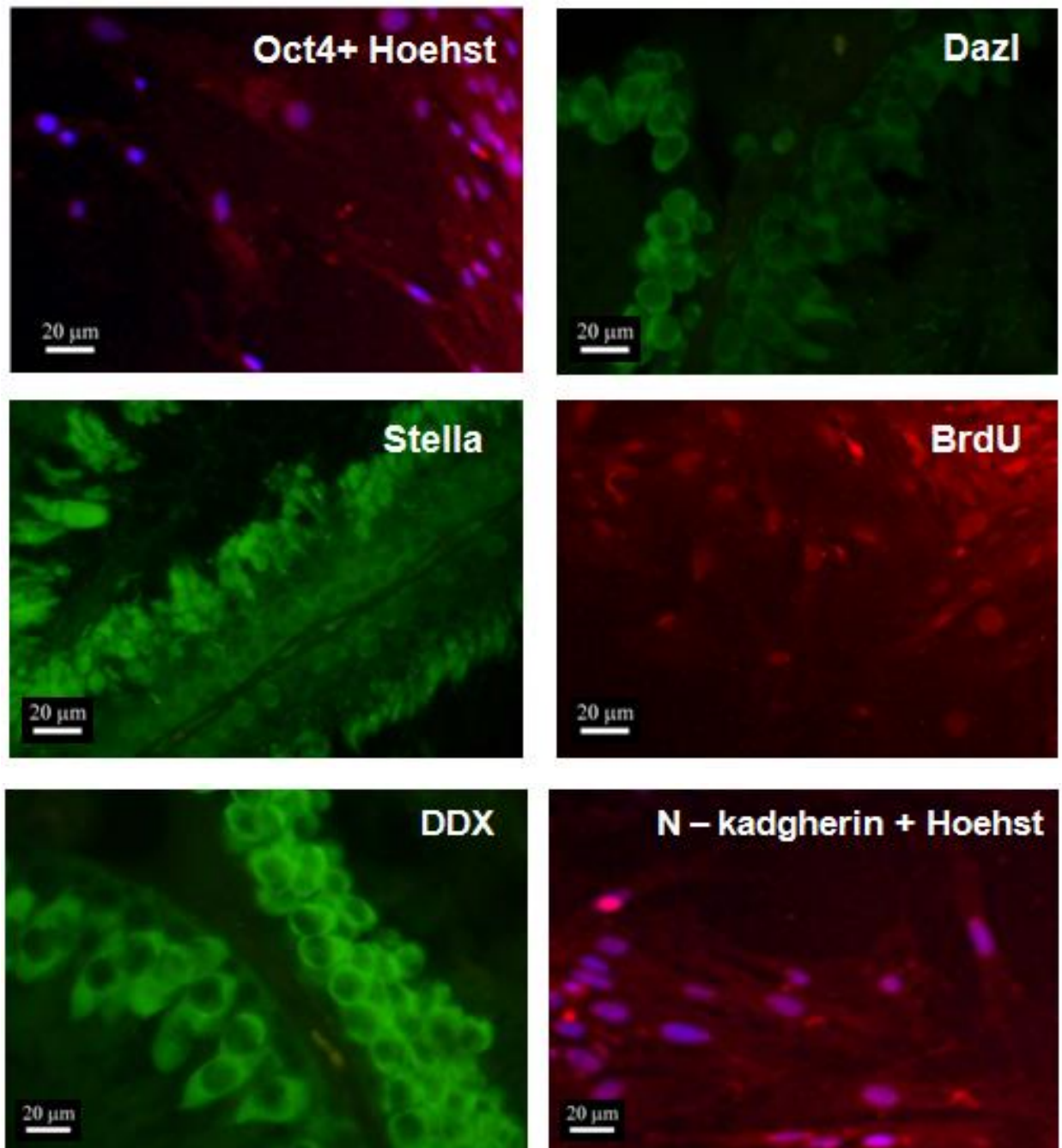


Рисунок 18 – Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс на поздних сроках (90-120 сутки),  $\times 1200$

Полученные данные коррелируют с клинической картиной репродуктивного здоровья у экспериментальных животных, в поздние сроки наблюдения (90-120 сутки), которая определяется на основании показателей уровней общего тестостерона, ингибина Б, индексами сперматогенеза и фертильности.

#### 4.9 Заключение

В заключение следует отметить, что экспериментальная терапия культурами, обогащенными стволовыми / прогениторными клетками, в ксеноварианте способствует восстановлению сперматогенеза и фертильности у крыс с нарушениями сперматогенеза, возникшими вследствие стойкой абдоминальной экспозиции при моделировании двухстороннего крипторхизма в течение 21 суток, которая приводит к утрате сперматогенеза во всех канальцах. Несмотря на выраженное повреждение сперматогенного эпителия, в большинстве канальцев сохраняются признаки частичной прогениторной дифференцировки, что может служить основой для репаративных процессов после терапии обогащенными клеточными культурами, но те семенные канальцы, которые имеют частичное повреждение клеток Сертоли, даже к 90 суткам не имеют признаков сперматогенеза, несмотря на наличие свободной клеточной ниши (рисунок12).

У животных всех экспериментальных групп после устранения двухстороннего абдоминального крипторхизма разрешение гипергонадотропного гипогонадизма происходило достаточно быстро и биохимические профили гормонов достигали нормальных уровней уже к 14 суткам, что подтвердило результаты, опубликованные нами ранее [14]. Восстановление концентраций ингибина Б к исходному уровню также происходило не ранее 90-120 суток наблюдения. При этом подтверждено, что уровень ингибина Б тесно коррелирует с состоянием сперматогенного эпителия семенных канальцев, а восстановление функции сперматогенного эпителия идет более медленно, по сравнению с темпами восстановления герминогенной функции яичек и уровня общего тестостерона.

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 сперматогенза у животных выявлено не было.

Наиболее продуктивным было восстановление сперматогенеза в группе животных, перенесших трансплантацию культуры клеток фетального яичка человека. В этой группекoefficient фертильности был самым высоким – 4,74, а общее количество беременностей в группе составило 58%. Наихудшие результаты получены в группе животных, перенесших терапию «микст» – культурой клеток костного мозга. В этой группе удалось получить только 1 беременность у 12 самок, соответственно коэффициент фертильности составил 0,75. Среднее количество беременностей в группах ксеноварианта – 33,27%. Среднее число новорожденных крысят –  $2,69 \pm 0,64$  в одном помете, что гораздо ниже, чем в стандартном помете, полученном от здорового самца (не меньше 7,0), причем их репродуктивный потенциал снижен, фактически в 2,5 раза по сравнению со здоровыми животными.

В группе контроля ни одной беременности получено не было.

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.

Данные иммуногистохимического анализа на поздних сроках (90-120 суток наблюдения) также коррелируют с данными клинической картины репродуктивного здоровья у экспериментальных животных, а терапия культурами в ксеноварианте может служить одним из способов восстановления фертильности у экспериментальных животных, имеющих нарушения сперматогенеза.

## Глава 5

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ КУЛЬТУРАМИ АЛЛОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

#### 5.1 Популяционные характеристики экспериментальных животных

Всего для исследования особенностей влияния экспериментальной терапии культурами в аллогенном варианте, использовались 20 половозрелых крыс самцов Wistar и 30 половозрелых самок для контроля фертильности. Все крысы самцы, участвующие в эксперименте, изначально были фертильными. Для контроля использовалась небольшая группа животных (крысы Wistar, n=10).

#### 5.2 Характериологические особенности клеточных аллогенных культур

Для оценки эффективности терапии обогащенными клеточными культурами в аллогенном варианте были использованы следующие культуры, представленные в таблице 30:

Таблица 30 – Характеристика культур, обогащенных аллогенными стволовыми и прогениторными клетками

№	Название ксеногенной культуры	Дозы	Витальность культуры (по трипановому синему)	Количество животных в группе	Количество операций
1	Обогащенная культура клеток яичка взрослой крысы линии Wistar	500000 ЕД в 2 яичка	92-97%	10	32
2	Обогащенная культура клеток яичка новорожденной крысы линии Wistar	500000 ЕД в 2 яичка	92-97%	10	32

При оценке эффективности аллогенного варианта терапии было использовано 2 группы экспериментальных животных (породная группа Wistar). При этом животным моделировался абдоминальный двухсторонний крипторхизм по Дендеберову-Кирпатовскому, затем через 3 недели экспозиции животным оперативным способом под белочную оболочку вводилась клеточная культура соответствующего вида и объема. В каждой группе было выделено по 4 животных, которые после пересадки находились под наблюдением для оценки фертильности, которых держали отдельно и сажали в клетки к самкам.

### 5.3 Результаты исследований гормонов крови в экспериментальных группах

Для оценки изменений гормонального профиля использовались изменения концентраций общего тестостерона, гонадотропных гормонов (ФСГ и ЛГ) и уровень Ингибина Б. Было отмечено, что во всех группах к 21 суткам отмечалось снижение базовых концентраций общего тестостерона больше чем на 50%, при этом разброс суммарных значений для каждого показателя был статистически достоверным ( $p=0,003$ ). К 14 суткам у всех животных было отмечено статистически достоверное повышение уровня тестостерона ( $p=0,039$ ) в среднем на 16,5%, к 28 суткам на 85-90% ( $p=0,048$ ) (диаграмма 18).

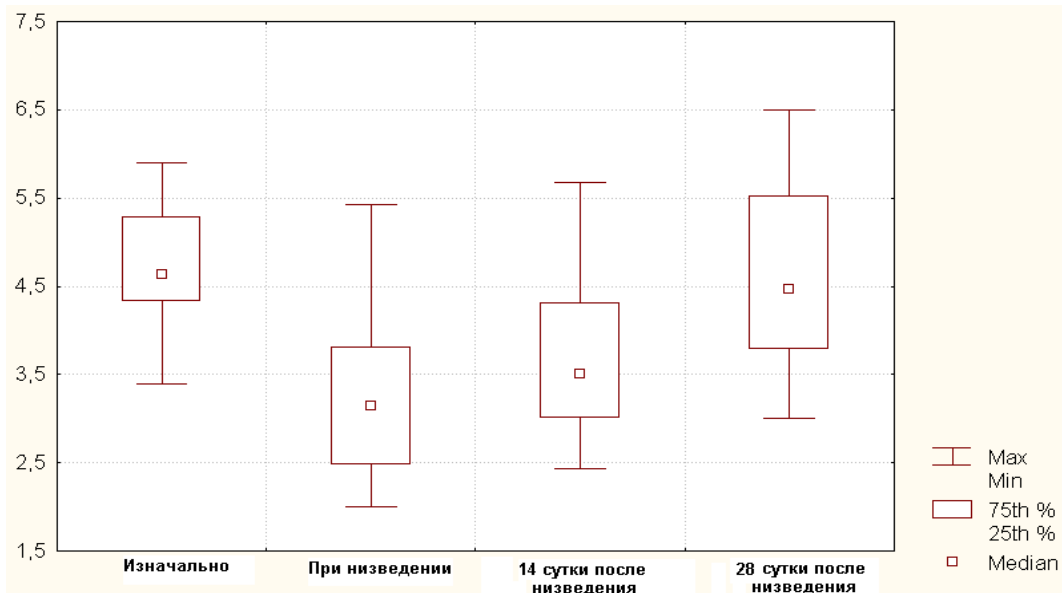


Диаграмма 18 – Изменения динамики общего тестостерона в группах ксеноварианта (приведены средние значения)

Для гонадотропных гормонов сыворотки крови (ФСГ и ЛГ) было зафиксировано некоторое компенсаторное повышение уровня к 21 суткам экспозиции яичек в брюшной полости, которое затем снизилось до исходных значений, но изменения были статистически недостоверны ( $p=0,074$ , для ФСГ и  $p=0,889$  для ЛГ).

К 21 суткам отмечены изменения уровня половых гормонов, характерных для гипергонадотропного гипогонадизма, который бывает при крипторхизме. Данные результаты подтверждают выводы, полученные нами в более ранних работах, но в большинстве своем полученные данные были статистически недостоверны.

Результаты исследования уровня Ингибина Б в этих группах выглядят следующим образом (диаграмма 19):

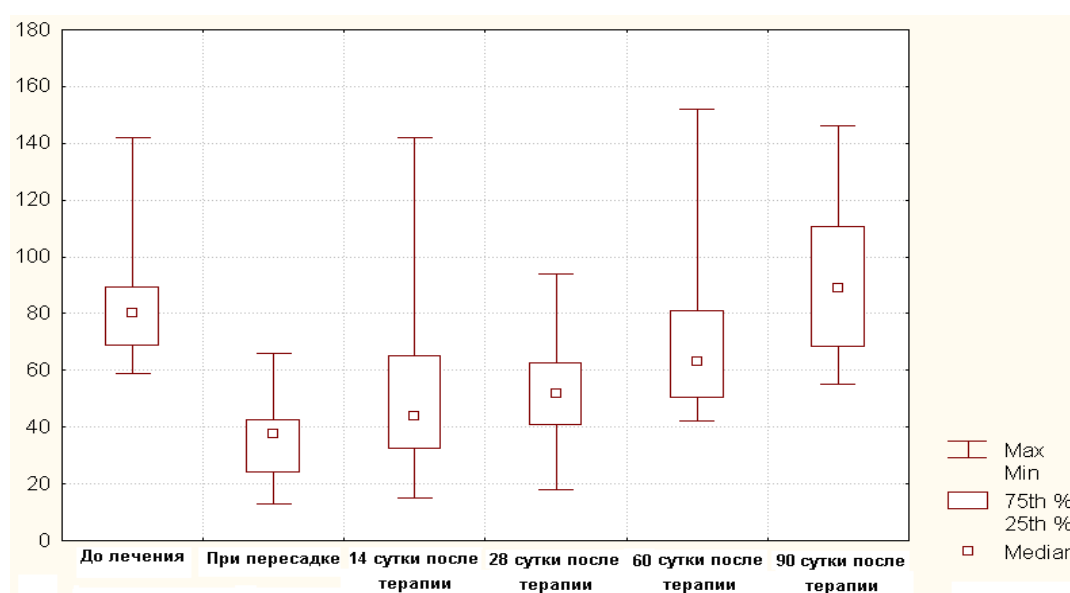


Диаграмма 19 – Изменения динамики Ингибина Б в группах аллогенного варианта (приведены средние значения)

В результате повреждения тканей яичка при двухстороннем абдоминальном крипторхизме отмечалось выраженное статистически достоверное снижение средних значений ингибина Б во всех группах к 21 суткам наблюдения (0,032 для 1 группы и 0,044 для 2). Статистически достоверное восстановление уровня ингибина Б в обеих группах до первоначального уровня отмечалось не ранее 90 суток ( $p=0,012$  и  $0,033$  соответственно). С учетом восстановления фертильности у экспериментальных животных, можно отметить, что уровень ингибина Б тесно коррелирует с состоянием сперматогенного эпителия семенных канальцев, а восстановление функции сперматогенного эпителия идет более медленно, по сравнению с активацией герминогенной функции яичек и уровнем общего тестостерона, который восстанавливается до нормальных значений уже к 14 суткам.

Таким образом, после экспериментальной терапии нарушений функции яичек культурами аллогенного происхождения, гормональный дисбаланс, характерный для гипогонадизма восстанавливается уже к 14 суткам, а нормальная функция сперматогенного эпителия восстанавливается не ранее 72 суток, что косвенно подтверждается изменением концентрации ингибина Б, которая восстанавливается до исходных значений не ранее 90 суток наблюдения.

#### 5.4 Морфологические исследования тканей яичек в группах аллогенного варианта

По данным проведенного морфологического исследования тканей яичек у крыс к 21 суткам в биоптатах наблюдаются следующие изменения, представленные на рисунке 19. Практически 100% канальцев лишены признаков сперматогенеза до конечных форм. В части канальцев сохранены отдельные элементы сперматогенеза и отдельные локусы с направленной дифференцировкой.

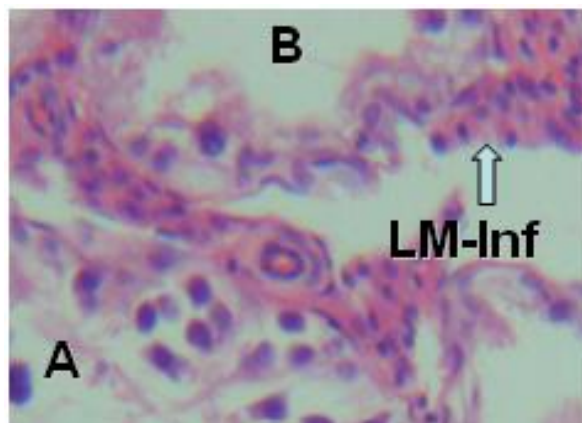


Рисунок 19 – Изменения характерные для 90 суток наблюдения (×200)

После использования терапии клеточными культурами в аллогенном варианте (рисунок 20), к 90 суткам было отмечено, что большинство канальцев имеет признаки сперматогенеза (А), причем в отдельных канальцах он определяется до конечных форм, но в тех локусах, которые имели повреждение клеток Сертоли, к 90 суткам имеются признаки лишь частичной дифференцировки. Популяция клеток Лейдига (рисунок 20) по качественному составу не отличается от клеточных популяций при других вариантах терапии.

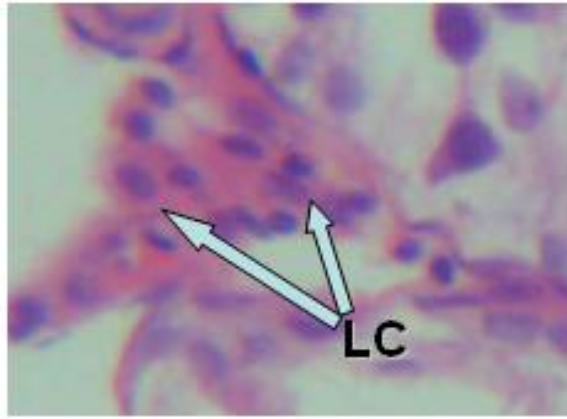


Рисунок 20 – Изменения популяции клеток Лейдига к 90 суткам (×410)

Следует отметить, что даже при наличии серьезных повреждений сперматогенного эпителия и практически полной утраты прогениторной дифференцировки, сохраняется возможность успешной репарации, и после терапии клеточными культурами в аллогенном варианте, в отдельных семенных канальцах экспериментальных животных, к 90 суткам мы можем наблюдать дифференцировку до конечных форм.

### 5.5 Исследование индекса сперматогенеза по Астраханцеву–Соловьеву

Интенсивность репарационных изменений при восстановлении сперматогенеза оценивалась по методу Астраханцева–Соловьева. Для этого в каждой группе было выделено 6 животных, у которых в сроки на 14, 28, 60, 90 и 120 сутки после терапии культурами обогащенными аллогенными стволовыми и прогениторными клетками проводился микроскопический анализ поперечных срезов семенных канальцев. Использовались данные билатерального варианта клеточной терапии.

При этом было выявлено, что у животных обеих групп, за исключением тех, которые участвовали в исследовании фертильности и изначально в гистологических исследованиях участия не принимали, восстановление сперматогенеза шло, как и в группах с ксеногенным вариантом терапии, шло примерно равными темпами. Прямых корреляций между видовым составом культуры и интенсивности репарации, а также качественным составом сперматогенеза у животных выявлено не было.

Результаты исследования индекса представлены в таблице 31.



Таблица 31 – Исследования индекса сперматогенеза у животных экспериментальных групп в аллогенном варианте

Название культуры	14 сутки	28 сутки	60 сутки	90 сутки	120 сутки
Обогащенная культура клеток яичка взрослой крысы линии Wistar	0,77±0,64 (p=0,65)	0,46±0,76 (p=0,07)	0,42±0,24 (p=0,02)	0,35±0,21 (p=0,01)	0,25±0,12 (p=0,05)
Обогащенная культура клеток яичка новорожденной крысы линии Wistar	1,4±0,97 (p=0,05)	0,84±0,2 (p=0,08)	0,72±0,21 (p=0,03)	0,38±0,1 (p=0,01)	0,28±0,18 (p=0,05)
Контроль (фантомные операции)	1,2±0,8 (p=0,756)	1,0±0,9 (p=0,338)	0,94±0,11 (p=0,462)	0,95±0,73 (p=0,333)	0,92±0,13 (p=0,119)

Во всех клинических группах отмечалось статистически достоверное снижение индекса сперматогенеза, что свидетельствует о хороших репаративных возможностях местных тканей яичка на фоне использования экспериментальной терапии клеточными культурами. Тем не менее, динамика изменений индекса сперматогенеза не коррелирует с показателем фертильности, данные изучения которой представлены ниже (диаграмма 20).

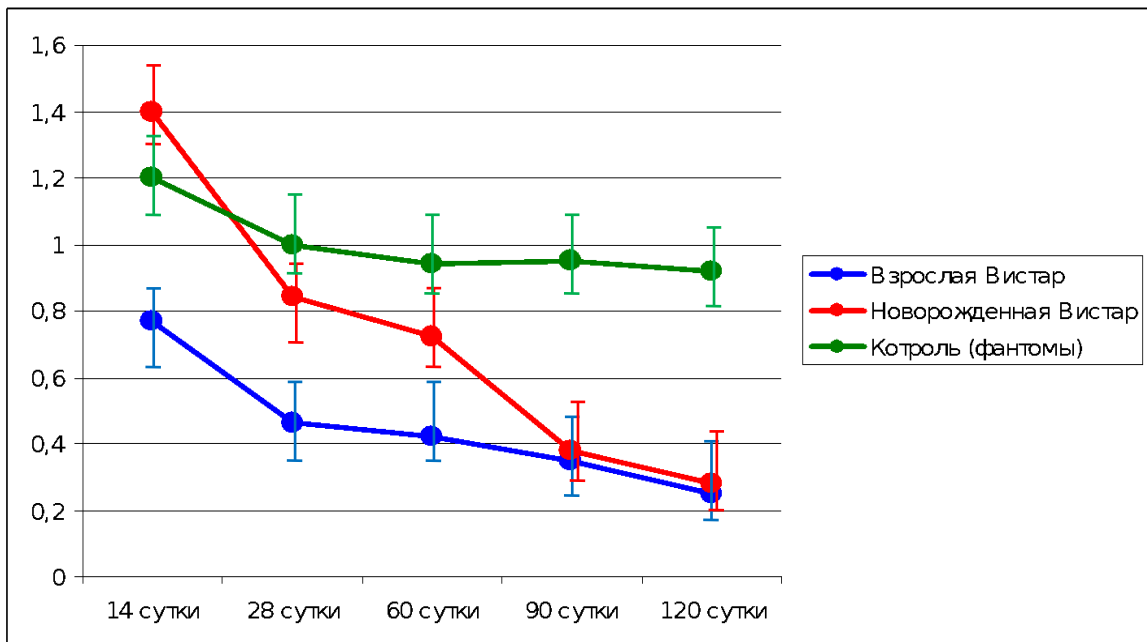


Диаграмма 20 – Исследования индекса сперматогенеза у животных экспериментальных групп в аллогенном варианте

## 5.6 Исследование фертильности экспериментальных животных

При исследовании фертильности в аллогенных группах было отмечено появление потомства во всех группах. Несмотря на то, что новорожденные крысята были здоровы, число новорожденных было значительно меньше, чем у здоровых животных, как и в ксеноварианте. Данные полученные в исследовании представлены в таблице 32.

Таблица 32 – Исследование фертильности у животных перенесших терапию обогащенными культурами в аллогенном варианте

№	Название группы	Кол-во самок (1:3)	Количество беременностей в группе (абс./%)	Среднее число крысят в помете	Коэффициент фертильности в группе на 1 самца
1	Обогащенная культура клеток яичка взрослой крысы линии Wistar	12	2,0/16,66%	2,5±0,7	1,25
2	Обогащенная культура клеток яичка новорожденной крысы линии Wistar	12	3,0/25,0%	3,33±0,57	2,49
3	Контроль (фантомные операции)	12	0,0	0,0	0,0

Наиболее продуктивным было восстановление сперматогенеза у группы животных, перенесших трансплантацию культуры яичка новорожденной крысы Wistar, причем коэффициент фертильности в этой группе был самым высоким – 2,49, а общее число беременностей – 25,0%. В группе животных, перенесших терапию культурой клеток яичка взрослой крысы Wistar, удалось получить только 2 беременности у 12 самок, соответственно коэффициент фертильности самцов составил 1,25, а частота возникновения беременностей составила 20,83%.

При этом, среднее число новорожденных крысят составило  $2,9 \pm 0,58$ , что гораздо ниже числа в обычном помете. Тем не менее, животных, давших потомство, можно считать фертильными, но их коэффициент фертильности в 2,0 раза ниже, чем у здоровых крыс. В группе контроля беременностей не было.

## **5.7 Иммуногистохимический маркерный анализ групп аллогенного варианта**

Для контроля за репаративными процессами в клеточной терапии в аллогенном варианте, использовались специфичные маркеры, представленные в таблице 6, для оценки процессов, трансформации, стволовой дифференцировки, прогениторной дифференцировки, а также маркеры стволовости и пролиферации.

### ***5.7.1 Иммуногистохимическая характеристика тканей реципиента после аллогенной клеточной терапии***

Для оценки эффективности терапии в аллогенном варианте использовались культуры клеток яичка новорожденной и взрослой крысы линии Wistar, показавших сходные результаты восстановления уровня гормонов крови, сперматогенеза и фертильности, вне зависимости от видовой принадлежности донора и вида клеточных культур. Выживаемость культур на момент введения под белочную оболочку, при окраске трипановым синим и витальным красителем составила, согласно таблице 30 – 92-97%.

### ***5.7.2 Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс на ранних сроках (до 28 дня наблюдения)***

Для удобства иммуноморфологической оценки репаративных изменений в раннем послеоперационном периоде, мы использовали ряд специфических антительных красителей, которые позволяли одновременно оценить возможность активности стволовых и прогениторных клеток (маркер Oct-4), активность клеточной трансформации (маркер Dazl), активность клеточной дифференцировки (маркеры Stella или DDX) и активность прогениторной пролиферации (маркер BrdU). Результаты данной оценки представлены на рисунке 21.

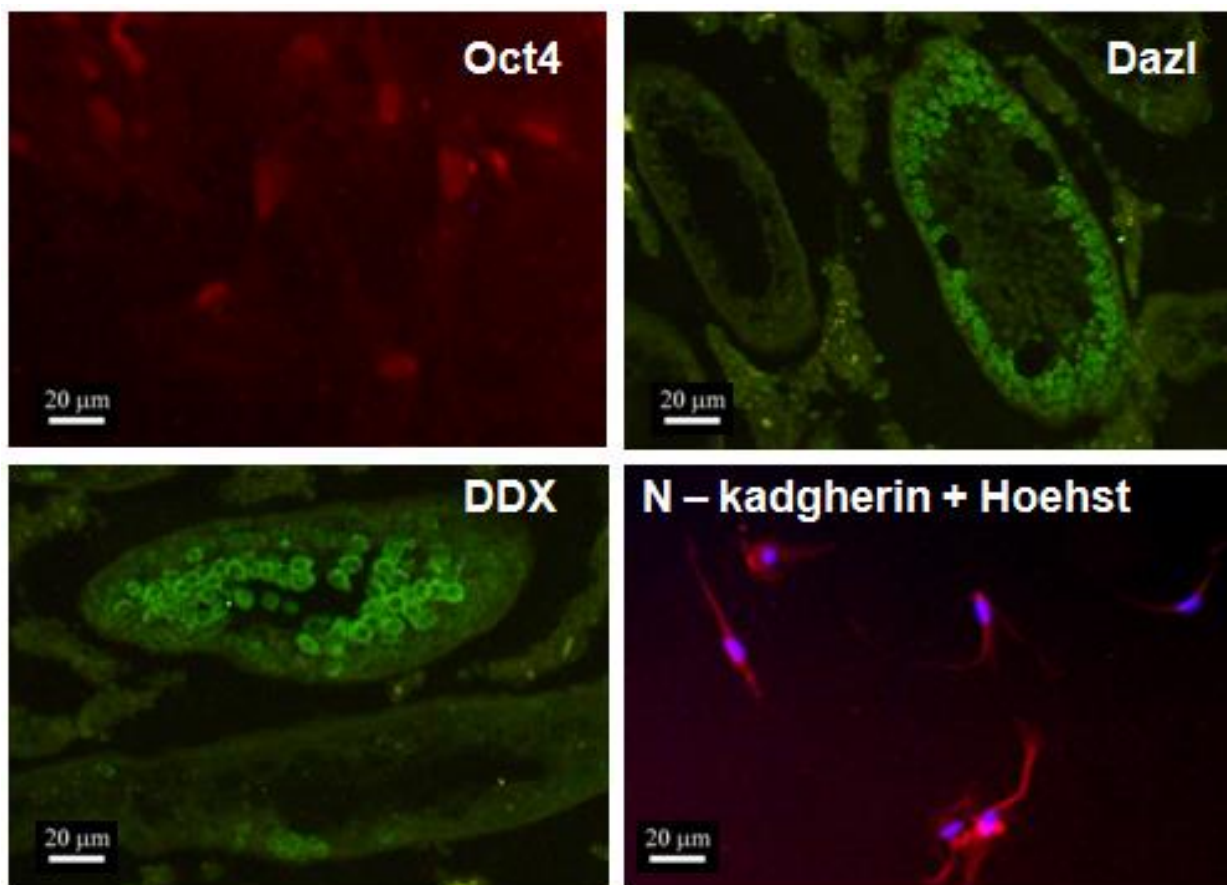


Рисунок 21 – Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс на ранних сроках,  $\times 800$

По данным комбинированного маркерного анализа выявлено, что на ранних стадиях после терапии обогащенными клеточными культурами, в канальцах с сохранной популяцией клеток Сертоли, начинается репаративная активность. При этом хорошо видна активность ССК, которые начинают прогениторную трансформацию и пролиферацию. Активность такой трансформации хорошо видна при окраске Dazl. Тем не менее, активность клеточной пролиферации не везде одинакова, в частности, при окраске моноклональными антителами к маркеру DDX хорошо видно, что только отдельные канальцы демонстрируют высокую пролиферативную активность. Гораздо чаще встречаются канальцы без признаков активной пролиферации.

Тем не менее, те канальцы, в которых активирован процесс прогениторной дифференцировки, демонстрируют активную прогениторную пролиферацию (окраска антителами к N – kadgherin и Hoehst 3344), что также коррелирует с данными гистологической картины семенников крыс, индексами сперматогенеза и уровнем половых гормонов.

### 5.7.3 Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс на поздних сроках (90-120 дни наблюдения)

По данным проведенных исследований на поздних сроках (90-120 суток после экспериментальной терапии в ксеноварианте) была зафиксирована выраженная прогениторная клеточная трансформация (Dazl), причем активность ССК у крыс остается, в эти сроки, весьма высокой, и подтверждается свечением антител, окрашенных к маркерам Oct-4 и ядерному красителю Хехст 3344. Активность прогениторной дифференцировки (Stella и DDX) и сперматогенной пролиферации также остается очень высокой, и подтверждается окраской антителами к N-кадгерину.

Представленные на рисунке 22 данные наблюдения иммуногистохимических исследований препаратов семенников экспериментальных животных коррелируют с клинической картиной репродуктивного здоровья у экспериментальных животных, в поздние сроки наблюдения (90-120 сутки), которая определяется на основании показателей уровней общего тестостерона, ингибина Б, индексами сперматогенеза и фертильности.

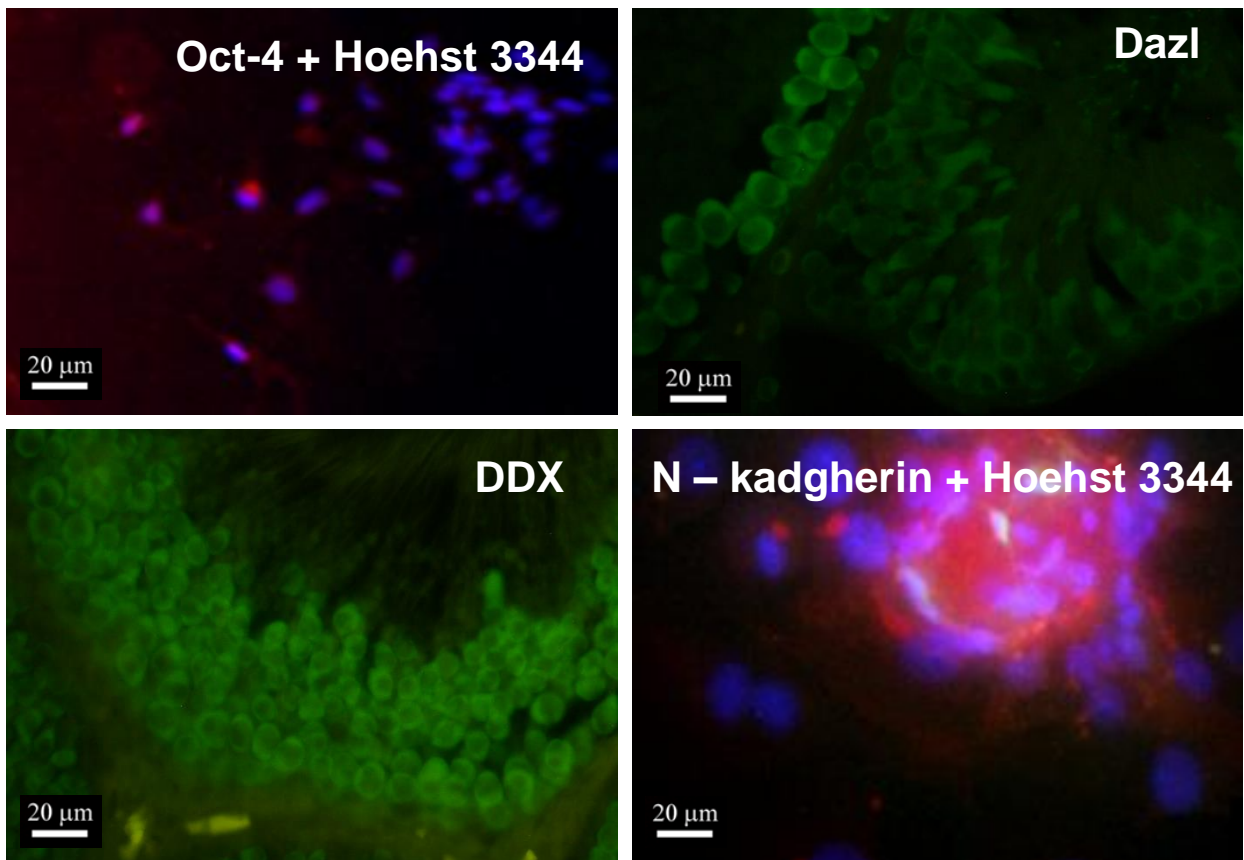


Рисунок 22 – Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс на поздних сроках (90-120 сутки), ×800-1200

## 5.8 Заключение

В заключение следует отметить, что экспериментальная терапия клеточными культурами аллогенной природы, способствует восстановлению сперматогенеза и фертильности у крыс с нарушениями сперматогенеза, возникшими вследствие стойкой абдоминальной экспозиции при моделировании двухстороннего крипторхизма в течение 21 суток, которая приводит к утрате сперматогенеза во всех канальцах. Тем не менее, в тех канальцах, где сохраняются признаки частичной прогениторной активности клеточная терапия в аллогенном варианте может послужить основой для активизации репаративных процессов. В тех семенных канальцах, где имеется частичное повреждение клеток Сертоли, даже к 90 суткам отсутствуют признаки сперматогенеза, несмотря на наличие свободных клеточных ниш (рисунок 12).

У животных всех экспериментальных групп после устранения двухстороннего абдоминального крипторхизма, разрешение гипогонадизма происходило достаточно быстро и биохимические профили тестостерона статистически достоверно достигали нормальных уровней уже к 14 суткам. Восстановление концентраций ингибина Б к исходному уровню также происходило не ранее 90-120 суток наблюдения, коррелирует с состоянием сперматогенного эпителия семенных канальцев, и восстановлением его функции.

Активация и регенерация сперматогенеза во всех группах, кроме контроля, происходило линейно, с разной интенсивностью и скоростью, и 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 интенсивностью репарации, а также качественным составом сперматогенеза у животных, как и в ксеногенном варианте, выявлено не было.

Несмотря на получение беременностей у самок обеих клинических групп, наиболее эффективным было восстановление сперматогенеза у животных, перенесших терапию культурой яичка новорожденной крысы Wistar. При этом коэффициент фертильности был самым высоким – 2,49, а общее число беременностей в группе составило 25%. У крыс, перенесших пересадку культуры яичка взрослой крысы Wistar удалось получить только 2 беременности у 12 самок, соответственно коэффициент фертильности составил 1,25. В среднем в аллогенных группах, частота возникновения беременностей составила 20,83%,

среднее число новорожденных –  $2,9 \pm 0,58$  в одном помете. Самцов породной группы Wistar давших потомство, можно считать фертильными по сравнению с контролем, но их репродуктивный потенциал, фактически в 2,0 раза ниже по сравнению со здоровыми животными.

По данным иммуногистохимических исследований выявлено, что уже на ранних сроках наблюдения в семенных канальцах активируются процессы прогениторной дифференцировки и пролиферации, которые остаются достаточно высокими к поздним срокам наблюдения (90-120 суток) и эти данные коррелируют с данными гистологической картины семенников крыс, индексами сперматогенеза и уровнем половых гормонов.

Таким образом, терапия аллогенными культурами, также может служить одним из способов восстановления фертильности у экспериментальных животных, имеющих нарушения сперматогенеза.

## Глава 6

**ТЕРАПИЯ КУЛЬТУРАМИ, ОБОГАЩЕННЫМИ СТВОЛОВЫМИ /  
ПРОГЕНИТОРНЫМИ КЛЕТКАМИ АУТОЛОГИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

**6.1 Популяционные характеристики экспериментальных животных**

Всего для исследования особенностей влияния экспериментальной терапии обогащенными клеточными культурами аутологичного происхождения использовались 10 половозрелых крыс самцов породы Campbell и 20 половозрелых самок породной группы Wistar для контроля фертильности. Все крысы самцы участвующие в эксперименте изначально были фертильными. Для контроля использовалась небольшая группа животных (крысы Wistar, n=10).

**6.2 Характериологические особенности клеточной культуры,  
обогащенной аутологичными стволовыми и прогениторными клетками**

Для оценки эффективности терапии обогащенными клеточными культурами в аутологичном варианте была использована культура яичка крысы линии Campbell. Животные этой группы являются генетическими близнецами, поэтому приготовленная культура из тестикул одного животного может считаться аутологичной культурой для другого животного этой линии. Характеристики аутологичной культуры представлено в таблице 33.

Таблица 33 – Характеристика культуры, обогащенных стволовыми / прогениторными клетками аутологичного происхождения

№	Название ксеногенной культуры	Дозы	Витальность культуры (по трипановому синему)	Количество животных в группе	Количество операций
1	Культура яичка взрослых крыс линии Campbell	500000 ЕД в 1 и 2 яичка	96-98%	10	32



Этим животным также моделировался абдоминальный двухсторонний крипторхизм по Дендеберову-Кирпатовскому, затем через 3 недели экспозиции животным оперативным способом под белочную оболочку вводилась аллогенная клеточная культура соответствующего вида и объема. Четыре животных этой группы после пересадки находились под отдельным наблюдением для оценки фертильности. Их держали отдельно и сажали в клетки к самкам.

### 6.3 Результаты исследований гормонов крови в экспериментальной группе

Для оценки изменений гормонального профиля также использовались измерения концентраций общего тестостерона, гонадотропных гормонов (ФСГ и ЛГ) и уровень Ингибина Б. При этом было отмечено, что у крыс линии Campbell к 21 суткам также отмечалось снижение базовых концентраций общего тестостерона больше чем на 50%, при этом разброс суммарных значений для каждого показателя был статистически недостоверным ( $p=0,077$ ) (диаграмма 21).

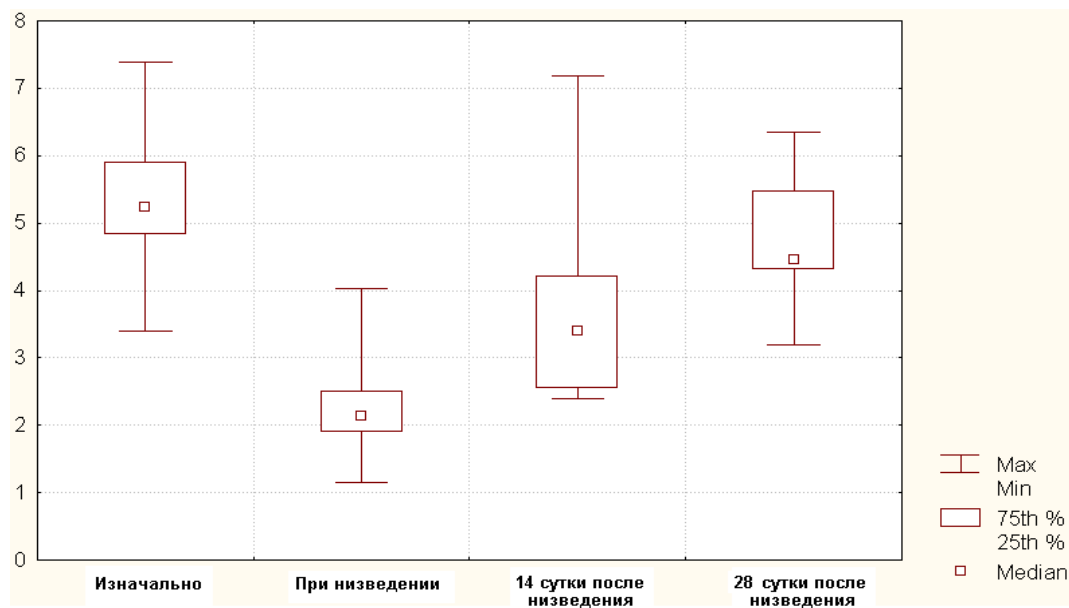


Диаграмма 21 – Изменения динамики общего тестостерона в аллогенной группе  
(приведены средние значения)

Для гонадотропных гормонов сыворотки крови (ФСГ и ЛГ), также, как и у животных других групп, было зафиксировано некоторое компенсаторное повышение уровней к 21 суткам экспозиции яичек в брюшной полости, которые затем снизились до исходных значений, но изменения были статистически недостоверны ( $p=0,467$ , для ФСГ и  $p=0,565$  для ЛГ).

К 21 суткам у крыс линии Campbell также отмечены статистически достоверные изменения ( $p=0,042$ ) уровня половых гормонов, характерных для гипергонадотропного гипогонадизма, который бывает при крипторхизме, как и у крыс породной группы Wistar.

Результаты исследования уровня Ингибина Б в этих группах выглядят следующим образом (диаграмма 22):

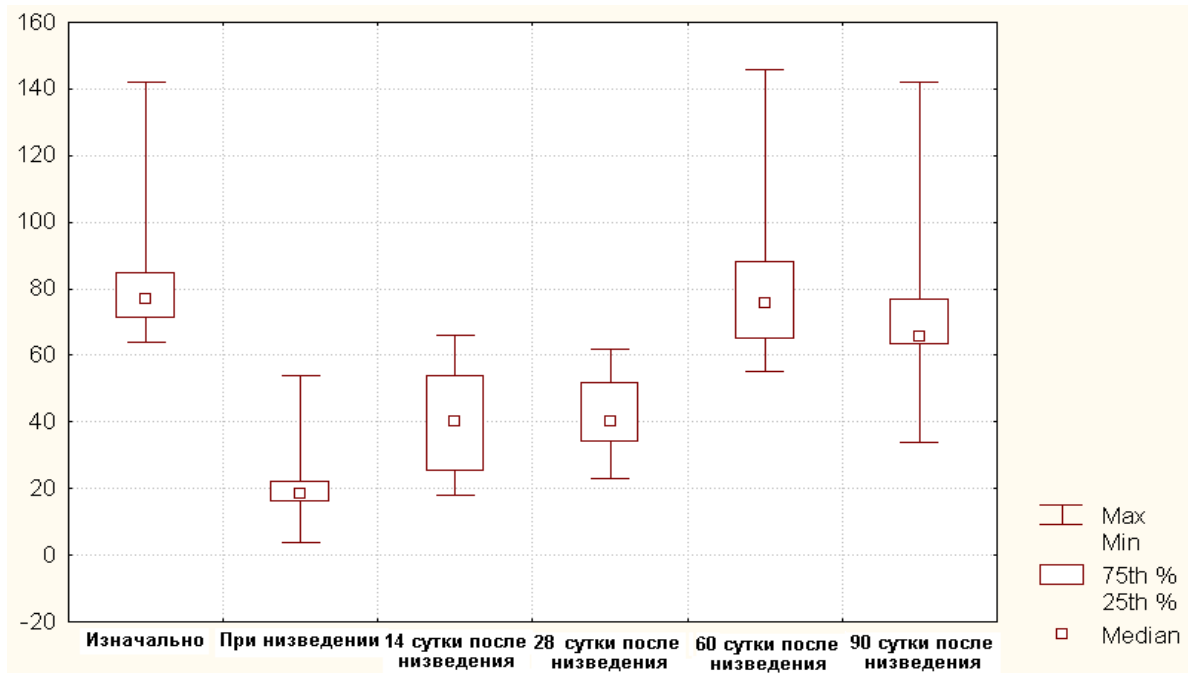


Диаграмма 22 – Изменения динамики Ингибина Б в аллогенной группе  
(приведены средние значения)

В результате повреждения тканей яичка при двухстороннем абдоминальном крипторхизме отмечалось выраженная отрицательная динамика средних значений ингибина Б к 21 суткам наблюдения. Восстановление изначальных значений уровня ингибина Б отмечалось уже к 60 суткам, тогда как в группах ксеногенного и аллогенного варианта это происходило только к 90 дню. Уровень ингибина Б у крыс линии Campbell тесно коррелирует с состоянием сперматогенного эпителия семенных канальцев, но восстановление функции сперматогенного эпителия статистически достоверно идет быстрее, чем в других вариантах терапии. Тестостеронообразующая функция яичек и уровень общего тестостерона у крыс линии Campbell восстанавливается до нормальных значений также к 14 суткам.

#### 6.4 Морфологические исследования тканей яичек в аллогенной группе

По данным проведенного морфологического исследования тканей яичек у крыс линии Campbell к 21 суткам в биоптатах наблюдаются изменения, аналогичные представленным на рисунке 24, в главе 3 настоящей работы, подтверждающим 100% повреждение канальцев, которые лишены признаков сперматогенеза до конечных форм. В большинстве из них определяются клетки Сертоли и единичные элементы дифференцировки стволовых клеток. Часть канальцев имеет и потери популяции клеток Сертоли, вследствие чего канальцы спадаются, и признаков начального сперматогенеза в них нет. В отдельных канальцах отмечается десквамация росткового слоя и умеренная лимфоцитарная инфильтрация.

После использования терапии культурой, обогащенной аллогенными стволовыми и прогениторными клетками, к 90 суткам было отмечено, что большинство канальцев имеет признаки сперматогенеза до конечных форм, но в тех локусах, которые утратили клетки Сертоли, даже к 90 суткам признаков прогениторной дифференцировки не выявлено (рисунок 23).

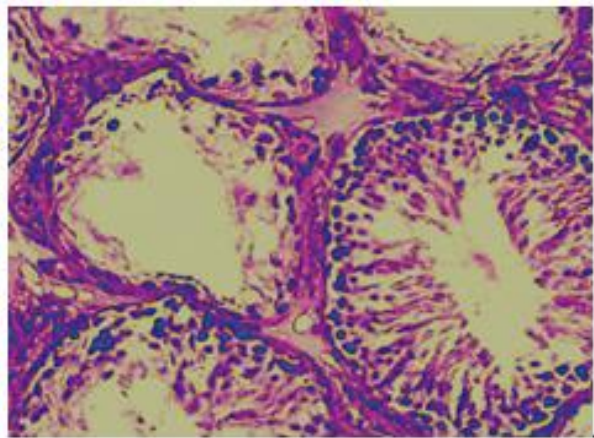


Рисунок 23 – Гистологическая картина ткани семенника крысы породы Campbell, 90 сутки ( $\times 200$ )

В группе контроля на 90 сутки отмечено что большинство семенных канальцев признаков сперматогенеза не имеет. Канальцы, имеющие отдельные элементы сперматогенеза единичны и в препаратах встречаются редко. Кроме того, в межканальцевых локусах ткани семенников крыс контрольной группы сохраняется умеренной выраженности лимфоцитарная инфильтрация (рисунок 24).

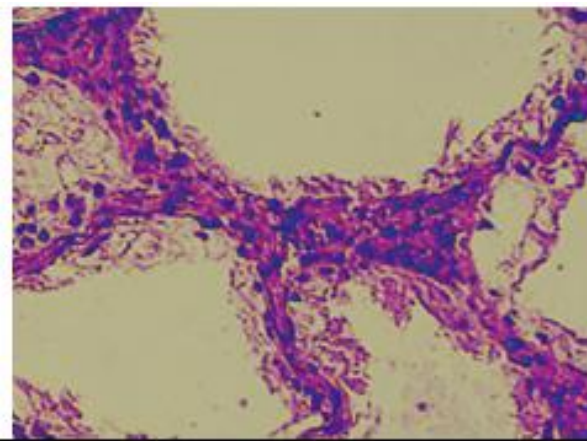


Рисунок 24 – Гистологическая картина ткани семенника контрольной крысы Wistar, 90 сутки ( $\times 200$ )

Таким образом, у крыс линии Campbell моделирование двухстороннего абдоминального крипторхизма в течение 21 суток приводит к нарушениям сперматогенеза во всех канальцах, аналогичных изменениям у крыс линии Wistar. В тех участках, где сохраняются признаки частичной прогениторной дифференцировки, аллогенная терапия служит основой для репаративных процессов. В группе контроля к 90 суткам семенные канальцы, имеют значительное повреждение клеток Сертоли, и не имеют признаков сперматогенеза, несмотря на наличие свободной клеточной ниши.

Состояние популяции клеток Лейдига к 90 суткам наблюдения в аутологичной группе аналогично состоянию этих клеток в других группах крыс линии Wistar. В группе контроля на фоне выраженной лимфоцитарной инфильтрации идентификация клеток Лейдига затруднена.

### **6.5 Исследование индекса сперматогенеза по Астраханцеву–Соловьеву**

Интенсивность репаративных изменений при восстановлении сперматогенеза в группе крыс линии Campbell также оценивалась по методу Астраханцева–Соловьева. В этой группе для этого было выделено 6 животных, у которых после выполнения орхфуникулоэктомии и изготовления гистологических препаратов производился расчет индекса сперматогенеза, произведенный на 14, 28, 60, 90 и 120 сутки после терапии. Результаты исследования индекса представлены в таблице 34.

Таблица 34 – Исследования индекса сперматогенеза у животных экспериментальных групп

Название культуры	14 сутки	28 сутки	60 сутки	90 сутки	120 сутки
Культура яичка взрослых крыс линии Campbell	1,1±0,23 (p=0,07)	0,82±0,37 (p=0,05)	0,4±0,55 (p=0,02)	0,21±0,1 (p=0,65)	0,18±0,08 (p=0,01)
Контроль	1,2±0,8 (p=0,756)	1,0±0,9 (p=0,338)	0,94±0,11 (p=0,462)	0,95±0,73 (p=0,333)	0,92±0,13 (p=0,119)

При этом было выявлено, что у всех групп животных, за исключением тех, которые участвовали в исследовании фертильности и изначально в гистологических исследованиях участия не принимали, восстановление сперматогенеза шло с различной интенсивностью, но примерно равными темпами (диаграмма 23).

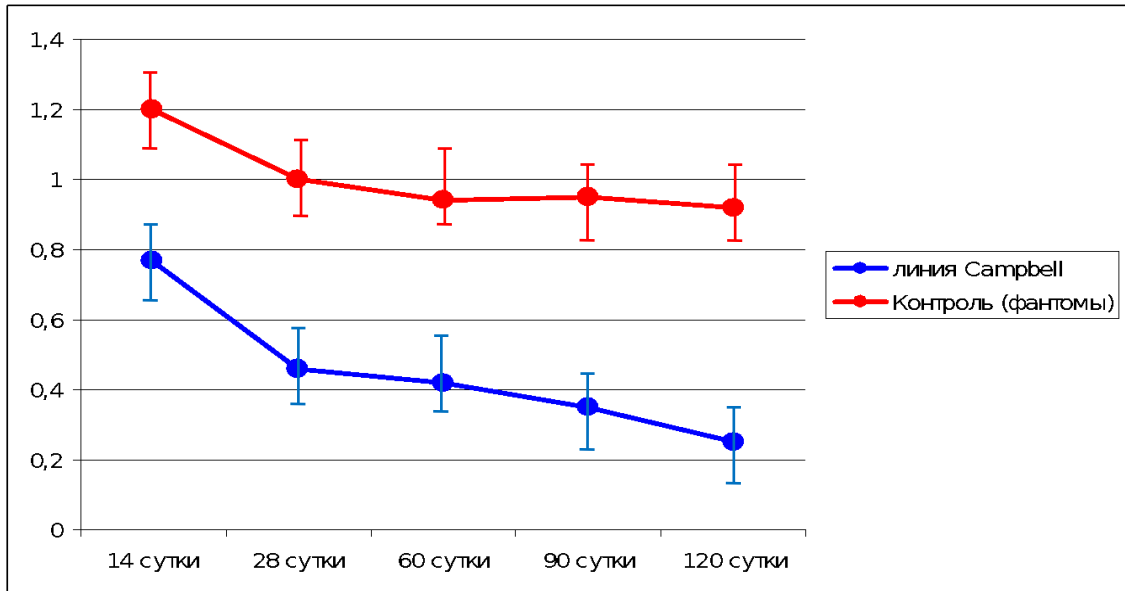


Диаграмма 23 – Исследования индекса сперматогенеза у животных аутологичной группы

В основной клинической группе (линия Campbell) отмечалось снижение индекса сперматогенеза, что свидетельствует о хороших репаративных возможностях местных тканей яичка, на фоне эффектов клеточной терапии.

## 6.6 Исследование фертильности крыс линии Campbell

При исследовании фертильности у крыс линии Campbell также было отмечено появление потомства, причем новорожденные крысята были здоровы хотя их число было значительно меньше, чем у здоровых животных (таблица 35).

Таблица 35 – Исследование фертильности у животных аутологичной группы и группы контроля

№	Название группы	Кол-во самок (1:3)	Количество беременностей в группе (абс./%)	Среднее число крысят в помете	Коэффициент фертильности в группе на 1 самца
1	Культура яичка взрослых крыс линии Campbell	12	5,0/41,66%	3,6±0,54	4,5
2	Контроль (фантомные операции)	12	0,0	0,0	0,0

В этой группе беременности были получены у 5 самок из 12 (41,6%), что является самым лучшим показателем среди всех клинических вариантов (в ксеногенном варианте количество беременностей в группе – 33,27%, в аллогенном – 20,83%).

Количество новорожденных крысят в одном помете составило 3,6±0,54 (для сравнения в ксеногенном варианте этот показатель составил 2,69±0,64, а в аллогенном – 2,9±0,58). Безусловно, что количество новорожденных ниже чем у здоровых животных, но коэффициент фертильности оперированных самцов в аутологичном варианте один из самых высоких – 4,5 (для сравнения в ксеногенном варианте составил – 4,74, в аллогенном варианте – 2,49).

Эти результаты также следует признать успешными, так как в группе контроля, ни одной беременности получено не было.

## 6.7 Иммуногистохимический маркерный анализ в группе животных, получавших терапию культурами аутологичного происхождения

Для контроля за репаративными процессами на фоне клеточной терапии в аутологичном варианте, использовались специфичные маркеры, представленные в таблице 6.

Таким образом, как и в работе с другими группами животных, у крыс линии Campbell использовались маркеры для оценки процессов, трансформации, стволовой дифференцировки, прогениторной дифференцировки, а также маркеры стволовости, межклеточного контактного взаимодействия и пролиферации.

#### ***6.7.1 Иммуногистохимическая характеристика тканей реципиента после аутологичной терапии культурами, обогащенными стволовыми / прогениторными клетками***

Для оценки эффективности терапии в ксеноварианте использовались культуры различных видов, показавших сходные результаты восстановления уровня гормонов крови, сперматогенеза и фертильности, вне зависимости от видовой принадлежности донора и вида клеточных культур. Выживаемость культур на момент введения под белочную оболочку, при окраске трипановым синим и витальным красителем составила, согласно таблице 33 – 92-97%.

#### ***6.7.2 Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс на ранних сроках (до 28 дня наблюдения)***

Для удобства иммуноморфологической оценки репаративных изменений в раннем послеоперационном периоде мы использовали ряд специфических красителей, которые позволяли одновременно оценить возможность активности стволовых и прогениторных клеток (маркер Oct-4), активность клеточной трансформации (маркер Dazl), активность клеточной дифференцировки (маркеры Stella или DDX) и активность прогениторной пролиферации (маркеры BrdU или ядерный краситель Hoechst 3344). Результаты данной оценки представлены на рисунке 25.

По данным комбинированного маркерного анализа выявлено, что на ранних стадиях после терапии обогащенными клеточными культурами, встречаются каналцы, которые имеют признаки репаративной активности. При этом хорошо видна активность ССК, которые начинают прогениторную трансформацию и пролиферацию. Активность такой трансформации хорошо видна при окраске Dazl уже на ранних сроках – 28 сутки наблюдения (рисунок 25). Тем не менее, активность клеточной пролиферации не везде одинакова, в частности, при окраске моноклональными антителами к маркеру DDX хорошо видно, что отдельные каналцы демонстрируют высокую пролиферативную активность, в то время как гораздо чаще встречаются каналцы с минимальной пролиферацией.

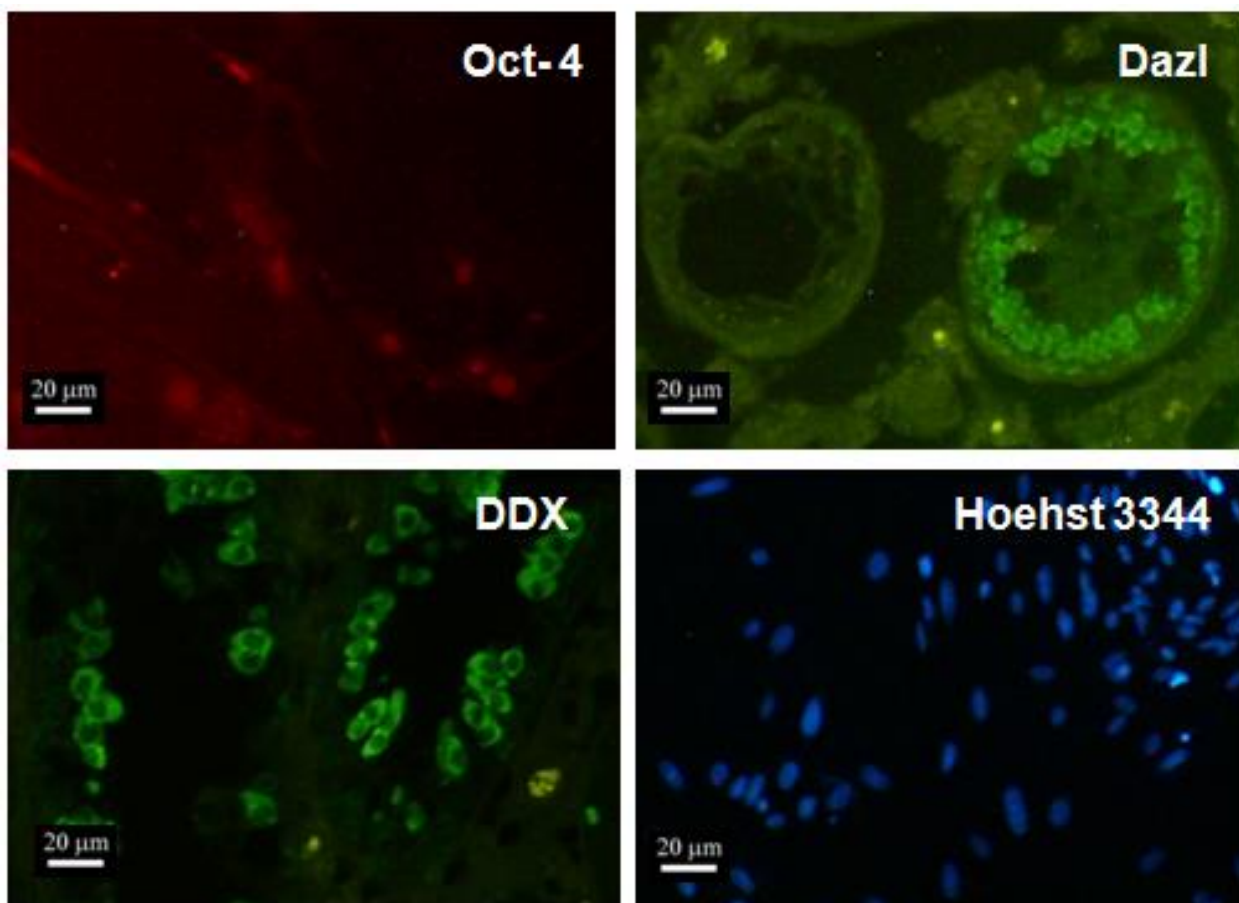


Рисунок 25 – Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс линии Campbell на ранних сроках,  $\times 400$

Тем не менее, после аутологичной терапии обогащенными клеточными культурами, те канальцы, в которых активирован процесс прогениторной дифференцировки, демонстрируют активную прогениторную пролиферацию (окраска антителами к Hoechst 3344), что коррелирует с данными гистологической картины семенников крыс, индексом сперматогенеза и уровнем половых гормонов.

### ***6.7.3 Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс Campbell на поздних сроках (90-120 дни наблюдения)***

На более поздних сроках наблюдения данные иммуногистохимических исследований препаратов семенников экспериментальных животных представлены на рисунке 26.



По данным проведенных исследований на поздних сроках (90-120 суток после экспериментальной терапии в аутологичном варианте) была зафиксирована выраженная прогениторная клеточная трансформация (Dazl), причем активность ССК у крыс линии Campbell остается, весьма высокой, и подтверждается свечением антител, окрашенных к маркерам Oct-4. Активность прогениторной дифференцировки (DDX) и сперматогенной пролиферации также остается очень высокой (BrdU).

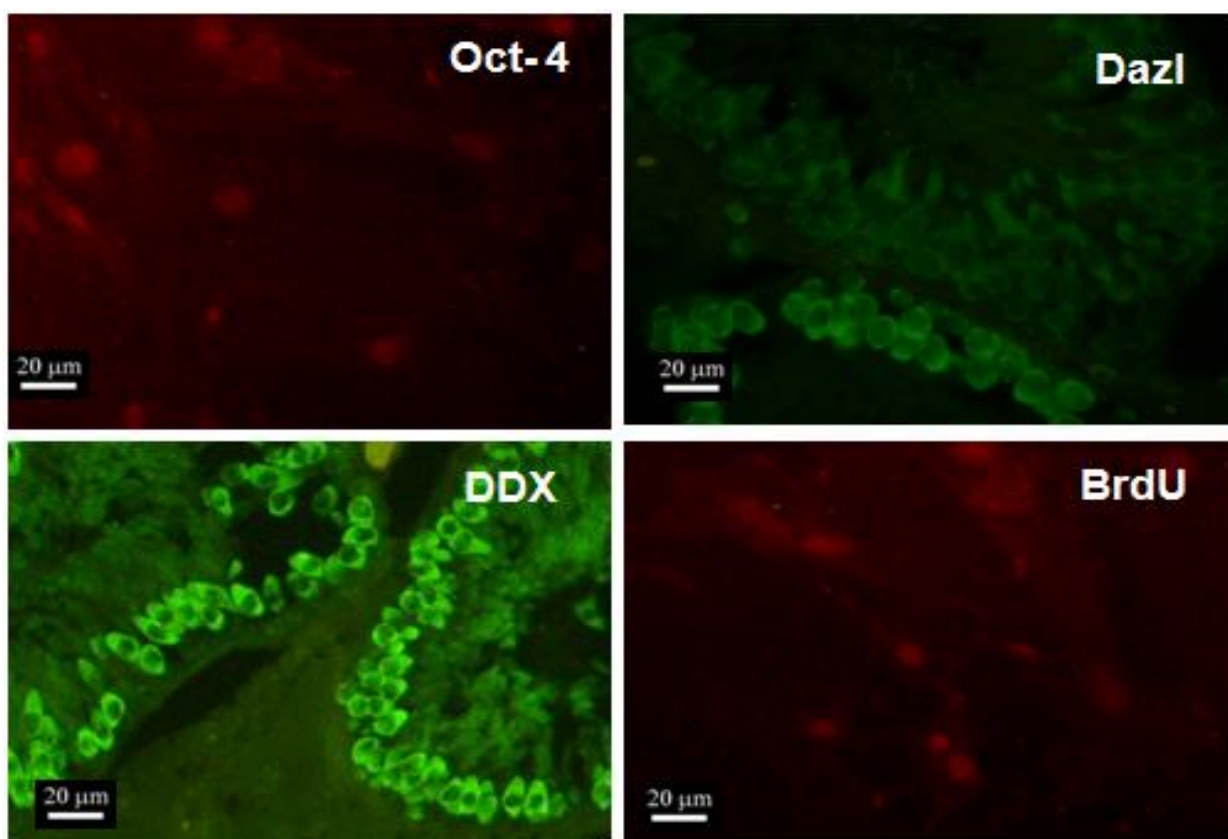


Рисунок 26 – Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс линии Campbell на поздних сроках (90-120 сутки), ×800

Полученные данные коррелируют с клинической картиной репродуктивного здоровья у крыс линии Campbell, в поздние сроки наблюдения (90-120 сутки), которая определяется на основании показателей уровней общего тестостерона, гонадотропинов, ингибина Б, а также индексами сперматогенеза и фертильности.

#### **6.7.4 Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс группы контроля на поздних сроках (90-120 дни наблюдения)**

В сроки наблюдения (90-120 дней) в группе контроля (крысы породной группы Wistar) при анализе данных иммуногистохимических исследований препаратов семенников выявлены следующие изменения, представленные на рисунке 27.

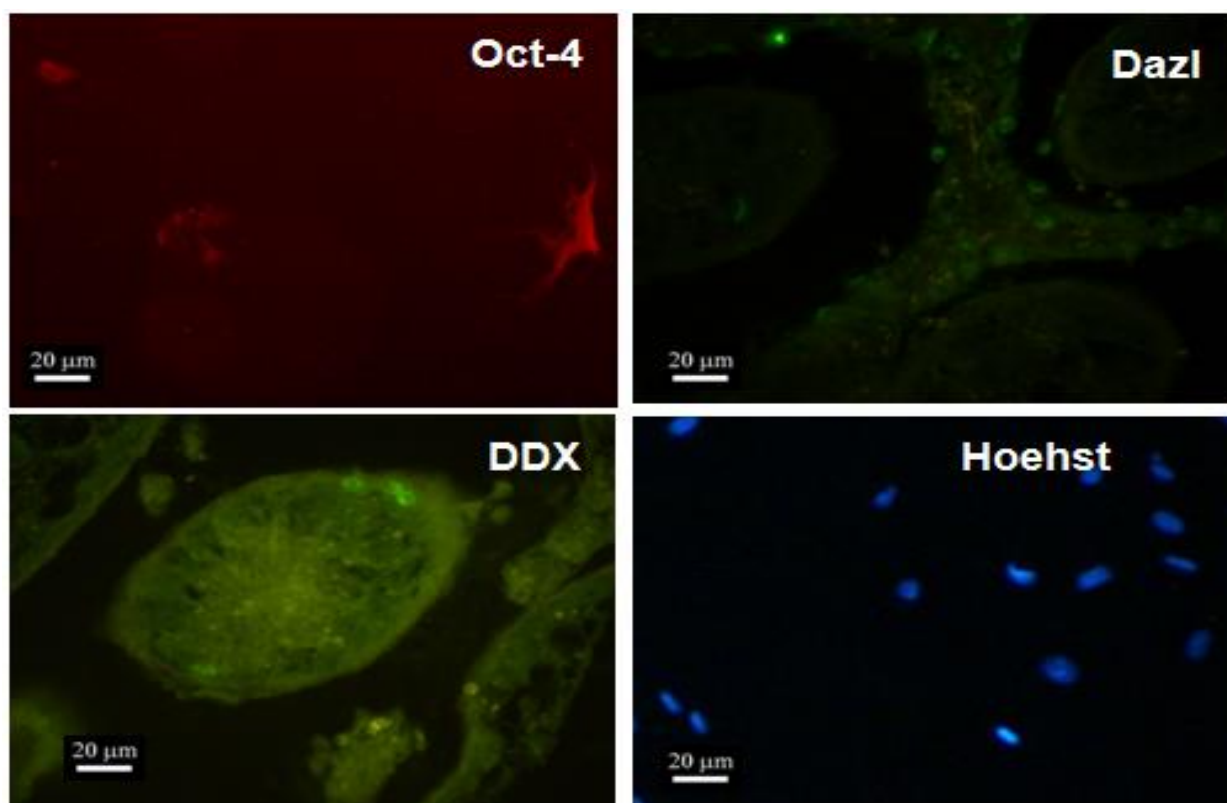


Рисунок 27 – Оценка репаративных особенностей ткани яичка крыс группы контроля на поздних сроках (90-120 сутки),  $\times 400$

В группе контроля на 90 сутки наблюдения была отмечена слабая активность сперматогенных стволовых клеток, в некоторых канальцах они были полностью утрачены. Интенсивность трансформации ССК, дифференцировки и пролиферативной активности была минимальной, что коррелирует с состоянием сперматогенеза и фертильностью.

## 6.8 Заключение

В заключение следует отметить, что экспериментальная терапия культурой, обогащенной аутологичными стволовыми и прогениторными клетками, способствует восстановлению сперматогенеза и фертильности у крыс с нарушениями сперматогенеза.

У крыс линии Campbell после устранения двухстороннего абдоминального крипторхизма и разрешения гипергонадотропного гипогонадизма, происходило достаточно быстрое восстановление уровня общего тестостерона, до нормальных значений 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 60 суткам наблюдения.

Восстановление сперматогенеза в аутологичном варианте происходило линейно, и к 90 суткам наблюдения крысы линии Campbell, имели полный цикл сперматогенеза, а 75% всех крыс линии Campbell достигли показателя фертильности. Эти данные подтверждены гистологическими исследованиями, измерениями индекса сперматогенеза и показателем фертильности.

Беременность была получена у 5 самок из 12 (41,6%), что также является сравнительно хорошим показателем, по сравнению с ксеногенными аллогенным вариантом.

Количество новорожденных крысят в одном помете составило  $3,6 \pm 0,54$  что является самым высоким показателем среди всех экспериментальных групп (в ксеногенном  $-2,69 \pm 0,64$ , в аллогенном  $-2,9 \pm 0,58$ ). Репродуктивный потенциал безусловно, ниже чем у здоровых животных, но коэффициент фертильности в аутологичном варианте сравнительно высокий – 4,5 (для сравнения самый высокий коэффициент фертильности в ксеногенном варианте составил – 4,74, а в аллогенном варианте – 2,49). В группе контроля, которая использовалась для сравнения всех основных групп и клинических вариантов терапии, ни одной беременности получено не было.

По данным иммуногистохимических исследований выявлено, что уже на ранних сроках наблюдения, каналы, 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.

Данные иммуногистохимического анализа на поздних сроках (90-120 суток наблюдения) также коррелируют с данными клинической картины репродуктивного здоровья у экспериментальных животных, а терапия клеточными культурами в аутологичном варианте может служить одним из основных способов восстановления фертильности у экспериментальных животных, имеющих нарушения сперматогенеза.

## Глава 7

### **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ: ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕРАПИИ КУЛЬТУРАМИ, ОБОГАЩЕННЫМИ СТВОЛОВЫМИ / ПРОГЕНИТОРНЫМИ КЛЕТКАМИ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЛИЯНИЯ ИНДУКТОРОВ СПЕРМАТОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ, ФАКТОРА БИЛАТЕРАЛЬНОСТИ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ДОЗЫ**

#### **7.1 Исследование особенностей репарационных процессов после терапии обогащенными клеточными культурами в зависимости от фактора билатеральности**

В данном исследовании принимали участие 3 группы животных, которые перенесли экспериментальную терапию клеточными культурами костного мозга человека, клетками фетального яичка человека и «микст» культурой мезенхимальных стволовых клеток человека, то есть культурами ксеногенного происхождения. В каждой группе из 10 животных – 4 получали инъекцию клеточной культуры под белочную оболочку в одно из яичек, остальные 6 крыс в 2 яичка. Все эти животные перенесли 3 недельную абдоминальную экспозицию и после введения клеточных культур, наблюдались согласно исследовательскому плану. Итого 12 самцов с моноорганной терапией и 18 с билатеральным вариантом. Эти животные перенесли одинаковые манипуляции и продемонстрировали данные, которые были сравнимы между собой.

##### ***7.1.1 Исследования уровней гормонального профиля в группах, перенесших одностороннюю и двухстороннюю терапию обогащенными клеточными культурами***

Изменения уровней общего тестостерона и гонадотропных гормонов представлены на диаграмме 24. По данным обследования уровней тестостерона и гонадотропных гормонов было выявлено, что секреция уровней общего тестостерона в группах существенно не различалась в течение всего периода наблюдения.

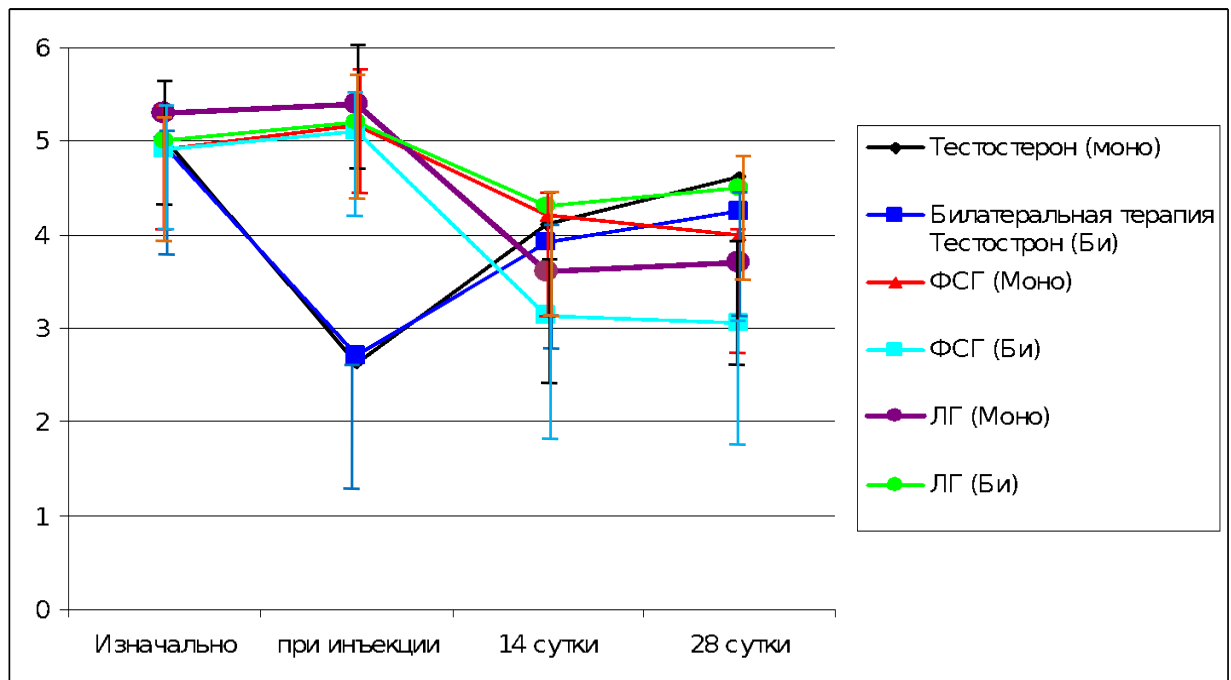


Диаграмма 24 – Изменения динамики общего тестостерона, ФСГ и ЛГ в группах Моно и Би (приведены средние значения)

Концентрации ФСГ и ЛГ после терапии статистически достоверно ( $p$  менее 0,05) линейно снижались, причем в группе Би отмечено более выраженное снижение ФСГ, по сравнению с ФСГ в группе Моно. По всей видимости, несмотря на общее улучшение клинической симптоматики по течению гипогонадизма у крыс, процессы репарации в яичке, в котором не было подкапсульного введения культуральной взвеси, текут менее интенсивно, что объясняет менее выраженное снижение уровня ФСГ к 28 суткам наблюдения.

Изменения уровней Ингибина Б в группах Моно и Би (диаграмма 25) демонстрируют статистически достоверную ( $p=0,001$ ) разницу между темпами нарастания уровня ингибина Б в группе Би, и изменением концентраций в группе Моно, причем к 90 суткам разница между величиной средних показателей составила более 20 пг/мл. Это свидетельствует о клинически более значимой репарации сперматогенного эпителия, одним из маркеров функциональности которого является ингибин Б, в группе перенесшей билатеральную терапию, по сравнению с результатами концентраций в группе Моно, что косвенно подтверждается изменениями концентраций сывороточного ФСГ, который является другим клинически значимым маркером функциональной активности сперматогенного эпителия, разница концентраций которого к 28 суткам была существенно меньше, по сравнению с данными в группе Моно.

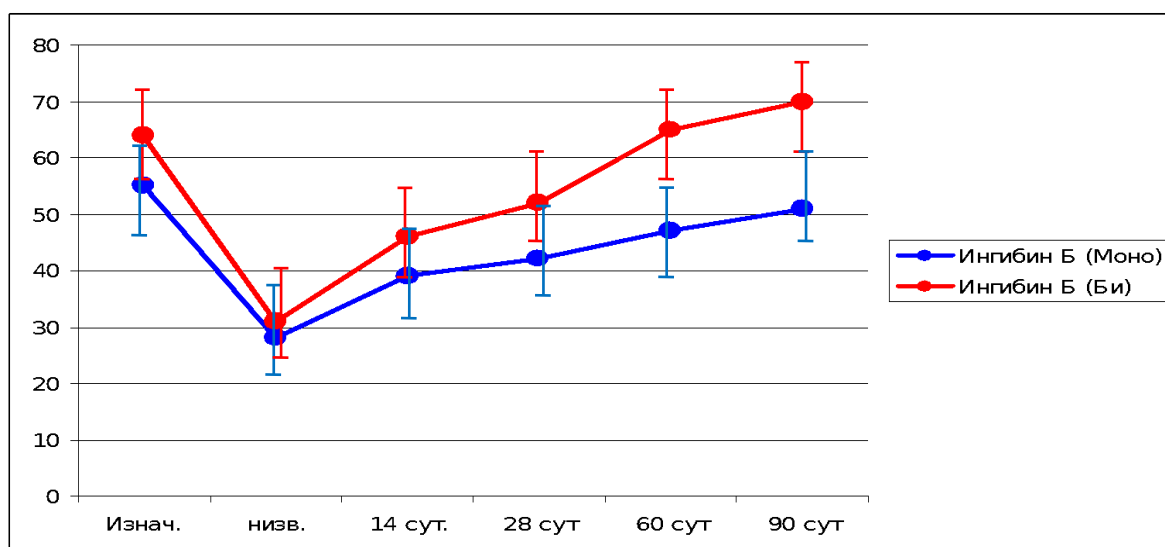


Диаграмма 25 – Изменения динамики Ингибина Б в группах ксеноварианта (приведены средние значения)

### 7.1.2 Исследование морфологических изменений в группах Моно и Би

Согласно данным морфологических исследований, в группах Моно и Би существенных отличий на 28 и 90 сутки выявлено не было.

Следует отметить, что к 90 суткам в межканальцевых локусах препаратов группы Моно сохранялась выраженная лимфоцитарная инфильтрация, что свидетельствует о вялотекущем воспалительном аутоиммунном процессе (рисунки 28, 29), причем гистологическая картина в правом и левом яичках у животных группы Моно к 90 суткам существенно не различалась. В группе Би воспалительная инфильтрация была намного меньше (рисунок 28).

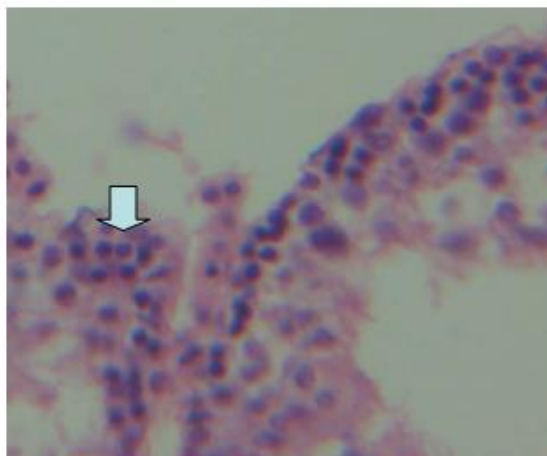


Рисунок 28 – Инфильтрация у животных группы Моно, 90 сутки, ×200

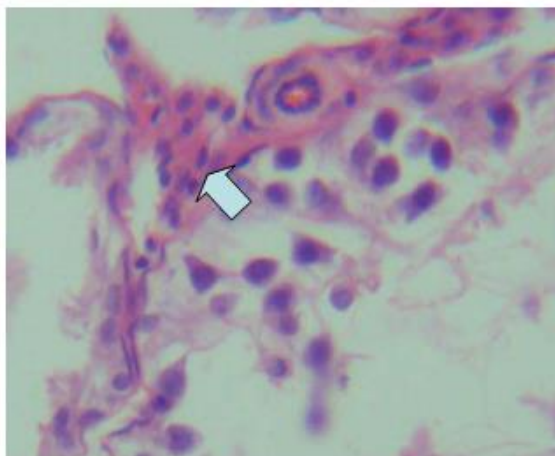


Рисунок 29 – Инфильтрация у животных группы Би, 90 сутки,  $\times 420$

Изменения популяции клеток Лейдига в исследовательских группах на поздних сроках наблюдения не отличались от основных групп, поэтому данные о их качественном составе мы не приводим.

### ***7.1.3 Исследование индекса сперматогенеза по Астраханцеву–Соловьеву в группах Моно и Би***

Результаты исследований индекса сперматогенеза представлены в таблице 36.

Таблица 36 – Исследование индекса сперматогенеза в группах Моно и Би

Название культуры	14 сутки	28 сутки	60 сутки	90 сутки	120 сутки
Культура человеческих мезенхимальных клеток (Моно)	1,0 $\pm$ 0,99 (p=0,07)	0,92 $\pm$ 0,41 (p=0,05)	0,45 $\pm$ 0,2 (p=0,02)	0,25 $\pm$ 0,12 (p=0,65)	0,23 $\pm$ 0,09 (p=0,01)
Культура человеческих мезенхимальных клеток (Би)	1,2 $\pm$ 0,57 (p=0,07)	0,94 $\pm$ 0,22 (p=0,05)	0,42 $\pm$ 0,24 (p=0,02)	0,22 $\pm$ 0,16 (p=0,65)	0,21 $\pm$ 0,09 (p=0,01)
Культура человеческих клеток фетального яичка (Моно)	1,2 $\pm$ 0,85 (p=0,05)	0,45 $\pm$ 0,23 (p=0,08)	0,42 $\pm$ 0,25 (p=0,03)	0,38 $\pm$ 0,19 (p=0,01)	0,26 $\pm$ 0,1 (p=0,05)
Культура человеческих клеток фетального яичка (Би)	1,1 $\pm$ 0,22 (p=0,05)	0,34 $\pm$ 0,28 (p=0,08)	0,31 $\pm$ 0,6 (p=0,03)	0,24 $\pm$ 0,17 (p=0,01)	0,2 $\pm$ 0,15 (p=0,05)



Продолжение таблицы 36

Название культуры	14 сутки	28 сутки	60 сутки	90 сутки	120 сутки
Культура клеток человеческого костного мозга (Моно)	1,0 ±0,44 (p=0,13)	0,85±0,5 (p=0,04)	0,74±0,42 (p=0,02)	0,38±0,26 (p=0,05)	0,28±0,01 (p=0,07)
Культура клеток костного мозга человека (Би)	1,2 ±0,44 (p=0,13)	0,8±0,69 (p=0,04)	0,73±0,7 (p=0,02)	0,38±0,1 (p=0,05)	0,27±0,05 (p=0,07)

Графически полученные данные представлены на диаграмме 26.

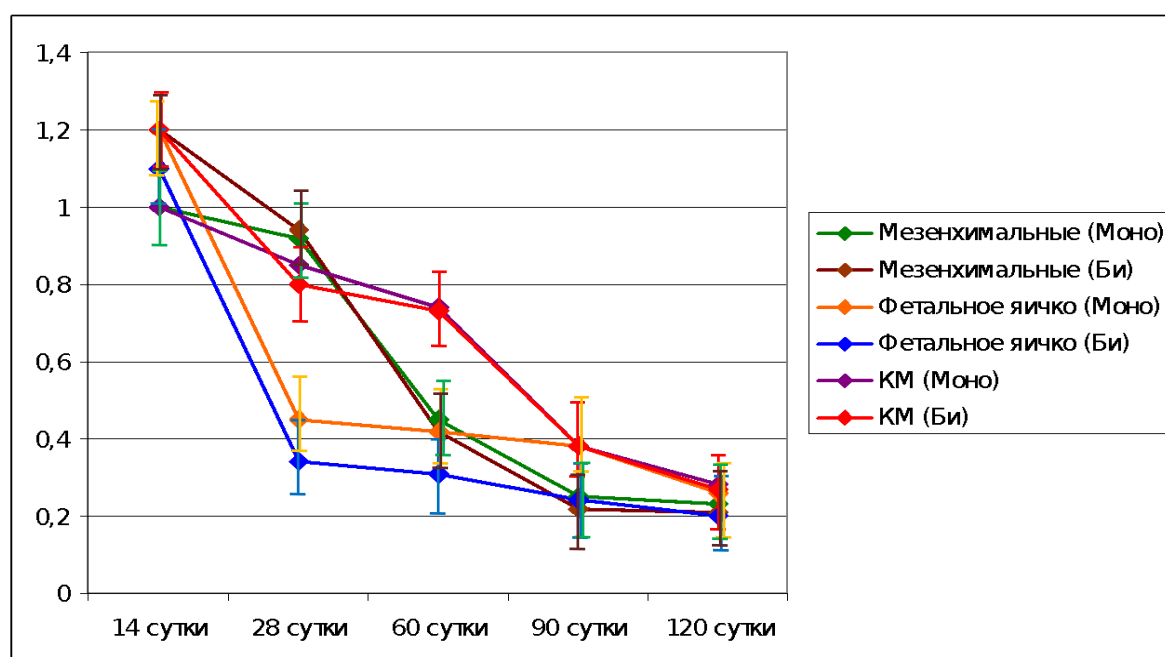


Диаграмма 26 – Изменения индекса Астраханцева–Соловьева в группах Моно и Би (приведены средние значения)

Вследствие большого количества критических значений выявить закономерности по данным индекса Астраханцева–Соловьева не удалось. Тем не менее, следует отметить, что у животных обеих групп уже к 28 суткам после манипуляции отмечено снижение индекса сперматогенеза, что подтверждается данными таблицы 36 и диаграммы 26, а наибольшее снижение индекса фертильности выявлено именно у животных группы Би. При динамическом наблюдении выявлено, что средние значения индекса сперматогенеза в группе животных, перенесших лечение культурой клеток фетального яичка (Би), несколько отличались от аналогичных значений в группе моно, хотя полученные данные были статистически недостоверны (p=0,07).

### 7.1.4 Исследование фертильности в группах Моно и Би

Согласно полученным данным, животные в группе Би после пересадки продемонстрировали более частое наступление беременностей – 37,5% у всех самок, против 16,6% всех самок в группе Моно, а также в 1,5 раза большее количество новорожденных крысят. Кроме того, самцы крыс группы Би имели в 4,39 раза больший коэффициент фертильности, что свидетельствует о наличии более выраженного репродуктивного потенциала у этих животных, по сравнению с группами Моно.

Результаты исследования фертильности в группах Моно и Би представлены в таблице 37.

Таблица 37 – Исследование фертильности в группах Моно и Би

№	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	4,0/16,6%	2,0 ±1,8	1,33
8	Группы Би	24	9,0/37,5%	2,93±0,1	4,39

В заключение следует отметить, 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.

## **7.2 Определение минимальной терапевтической дозы у животных, получивших терапию обогащенными клеточными культурам ксеногенного происхождения**

### ***7.2.1 Популяционная характеристика исследуемых групп***

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. Исследуемые терапевтические дозы представлены в таблице 38.

Животные, исследуемые в этих группах, перенесли 3 недельную абдоминальную экспозицию яичек и после введения клеточных культур наблюдались согласно общему исследовательскому плану, аналогично с другими группами животных.

### ***7.2.2 Исследования уровней гормонального профиля в группах, участвующих в исследовании минимальной терапевтической дозы***

Изменения уровней общего тестостерона и гонадотропных гормонов, а также ингибина Б в исследуемых группах соответствовали средним данным всех групп ксеноварианта, которые представлены на диаграммах 15, 16, в главе 3 настоящей работы.

Существенных отличий от представленных выше данных, вследствие полного и частичного совпадения графиков нам выявить не удалось.

Таблица 38 – Используемые терапевтические дозы

№	Название культуры	Используемые дозы на 1 яичко	Количество крыс
1	Культура клеток плаценты человека	500000 ЕД, 50000 ЕД, 5000 ЕД	5 крыс 5 крыс 5 крыс
2	Культура клеток пуповины человека	500000 ЕД, 50000 ЕД, 5000 ЕД	5 крыс 5 крыс 5 крыс
3	Культура клеток яичка мышей линии С-57 Black/6, несущих ген GFP	50000 ЕД, 5000 ЕД	5 крыс 5 крыс
4	Культура клеток висцеральной жировой ткани мышей линии С-57 Black/6, несущих ген GFP	500000 ЕД, 50000 ЕД,	5 крыс 5 крыс

### ***7.2.3 Исследование морфологических изменений в дозозависимых группах***

Согласно данным морфологических исследований, которые подробно описаны в пункте 3.4, главы 3, при сравнении гистологической картины семенников в дозозависимых группах существенных истатистически достоверных отличий на 28 и 90 сутки нам выявить не удалось.

Сохраняющаяся в межканальцевых локусах к 90 суткам лимфоцитарная инфильтрация, в равной степени интенсивности присутствовала во всех группах, что свидетельствует о вялотекущем сопутствующем воспалительном аутоиммунном процессе, причем гистологическая картина в семенниках животных дозозависимых групп к 90 суткам не различалась и напоминала гистологическую картину, представленную на рисунке 15. Изменения популяции клеток Лейдига в группах были статистически незначимы.

### 7.2.4 Исследование индекса сперматогенеза по Астраханцеву–Соловьеву в дозозависимых группах

Данные, полученные при исследовании индекса сперматогенеза представлены на диаграмме 27.

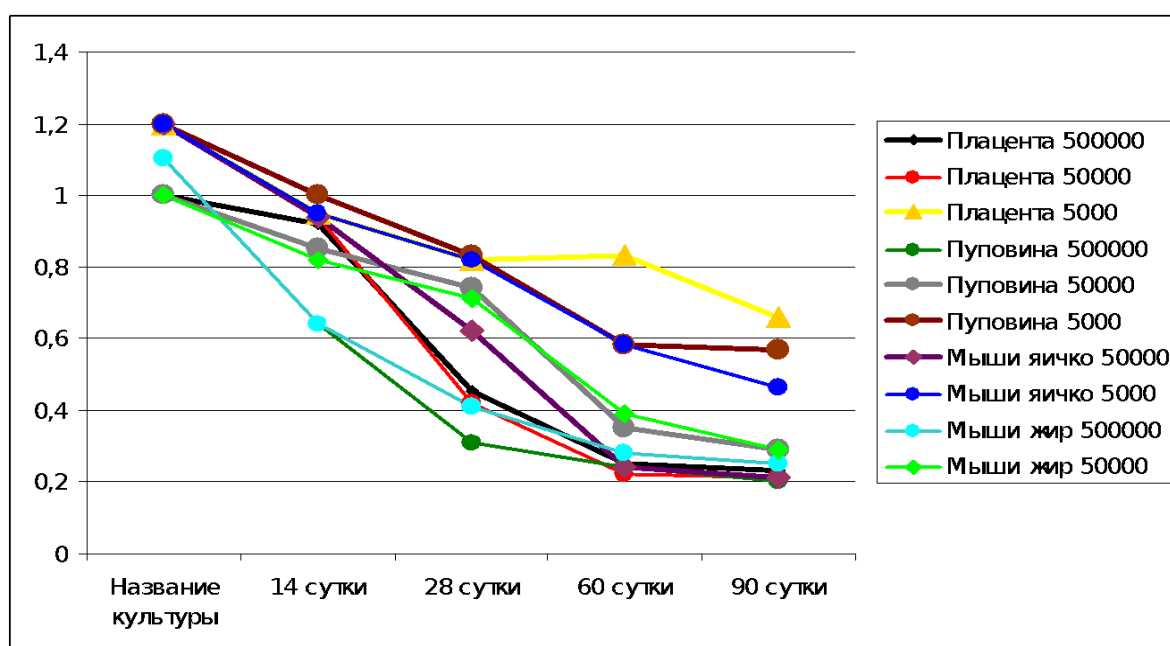


Диаграмма 27 – Изменения индекса Астраханцева–Соловьева в дозозависимых группах (приведены средние значения)

Результаты исследований представлены в таблице 39.

Таблица 39 – Исследование индекса сперматогенеза в дозозависимых группах

Название культуры	14 сутки	28 сутки	60 сутки	90 сутки	120 сутки
Культура клеток плаценты человека 500000 ЕД	1,0±0,99 (p=0,07)	0,92±0,41 (p=0,05)	0,45±0,2 (p=0,02)	0,25±0,12 (p=0,65)	0,23±0,09 (p=0,01)
Культура клеток плаценты человека 50000 ЕД	1,2±0,57 (p=0,07)	0,94±0,22 (p=0,05)	0,42±0,2 (p=0,02)	0,22±0,16 (p=0,65)	0,21±0,09 (p=0,01)
Культура клеток плаценты человека 5000 ЕД	1,2±0,85 (p=0,05)	0,95±0,23 (p=0,08)	0,82±0,2 (p=0,03)	0,83±0,19 (p=0,01)	0,66±0,1 (p=0,05)
Культура клеток пуповины человека 500000 ЕД	1,1±0,22 (p=0,05)	0,64±0,28 (p=0,08)	0,31±0,6 (p=0,03)	0,24±0,17 (p=0,01)	0,2±0,15 (p=0,05)

Продолжение таблицы 39

Название культуры	14 сутки	28 сутки	60 сутки	90 сутки	120 сутки
Культура клеток пуповины человека 50000 ЕД	1,0±0,44 (p=0,13)	0,85±0,5 (p=0,04)	0,74±0,4 (p=0,02)	0,35±0,26 (p=0,05)	0,29±0,01 (p=0,07)
Культура клеток пуповины человека 5000 ЕД	1,2±0,44 (p=0,13)	1,0±0,69 (p=0,04)	0,83±0,7 (p=0,02)	0,58±0,1 (p=0,05)	0,57±0,05 (p=0,07)
Культура клеток яичка мышей линии С-57 Black/6, несущих ген GFP 50000 ЕД	1,2±0,57 (p=0,07)	0,94±0,22 (p=0,05)	0,62±0,2 (p=0,02)	0,24±0,16 (p=0,65)	0,21±0,09 (p=0,01)
Культура клеток яичка мышей линии С-57 Black/6, несущих ген GFP 5000 ЕД	1,2±0,85 (p=0,05)	0,95±0,23 (p=0,08)	0,82±0,2 (p=0,03)	0,58±0,19 (p=0,01)	0,46±0,1 (p=0,05)
Культура клеток висцеральной жировой ткани мышей линии С-57 Black/6, несущих ген GFP, 500000 ЕД	1,1±0,22 (p=0,05)	0,64±0,28 (p=0,08)	0,41±0,6 (p=0,03)	0,28±0,17 (p=0,01)	0,25±0,15 (p=0,05)
Культура клеток висцеральной жировой ткани мышей линии С-57 Black/6, несущих ген GFP, 50000 ЕД	1,0±0,44 (p=0,13)	0,82±0,5 (p=0,04)	0,71±0,4 (p=0,02)	0,39±0,26 (p=0,05)	0,29±0,01 (p=0,07)

Вследствие большого количества критических значений выявить закономерности по данным индекса Астраханцева–Соловьева не удалось. Тем не менее, следует отметить, что по данным оценки индекса у животных, прошедших курс терапии в терапевтической дозе 5000 ЕД на 1 яичко, к 60 и 90 суткам после манипуляции, показатели индекса сперматогенеза, сохранялись близкими к 1,0. В других группах животных, у которых терапевтическая доза была больше, недостаточность клинического репарационного эффекта подтверждается графическими данными, представленными в таблице 6.4 и на диаграмме 6.4. Большинство полученных данных были статистически недостоверны (p=0,07).

### ***7.2.5 Исследование фертильности в группах***

Результаты исследования фертильности в группах Моно и Би представлены в таблице 40.

Таблица 40 – 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 500000 ЕД	8	2,0/25,0%	2,5±2,1	2,5
2	Культура клеток плаценты человека 50000 ЕД	8	1,0/12,5%	3,0	1,5
3	Культура клеток плаценты человека 5000 ЕД	8	0,0/0,0%	0,0	0,0
4	Культура клеток пуповины человека 500000 ЕД	8	4,0/50,0%	3,25±0,95	6,5
5	Культура клеток пуповины человека 50000 ЕД	8	1,0/25,0%	3,0	1,5
6	Культура клеток пуповины человека 5000 ЕД	8	0,0/0,0%	0,0	0,0
7	Культура клеток яичка мышей линии C-57 Black/6, несущих ген GFP 50000 ЕД	8	4,0/50,0%	2,33±0,57	4,66
8	Культура клеток яичка мышей линии C-57 Black/6, несущих ген GFP 5000 ЕД	8	0,0/0,0%	0,0	0,0
9	Культура клеток висцеральной жировой ткани мышей линии C-57 Black/6, несущих ген GFP, 500000 ЕД	8	3,0/37,5%	2,33±0,57	3,49
10	Культура клеток висцеральной жировой ткани мышей линии C-57 Black/6, несущих ген GFP, 50000 ЕД	8	0,0/0,0%	0,0	0,0
Суммарные данные по дозозависимым группам					
11	500000 ЕД	24	9,0/37,5%	2,69±0,48	4,035
12	50000 ЕД	32	6,0/18,75%	2,08±1,42	1,56
13	5000 ЕД	24	0,0/0,0%	0,0	0,0

При исследовании индекса фертильности в дозозависимых группах было выявлено, что животные, получившие терапию культурами, в дозах 500000 ЕД и 50000 ЕД в эксперименте дали потомство, которое было здоровым и фертильным, в отличие от животных получивших дозу 5000 ЕД. Эти животные остались инфертильными, несмотря на адекватный уровень половых гормонов и признаки некоторого снижения индекса сперматогенеза. Согласно полученным данным минимальной терапевтической дозой может считаться пул в 50000 ЕД, хотя частота наступления беременностей у самок в этих группах была в 2 раза ниже, чем при дозе 500000 ЕД на одно яичко. Поэтому более оптимальна терапевтическая доза 500000 ЕД, так как после пересадки эти животные обладали максимальным индексом фертильности, который был в 4 раза больший, чем в группе с дозой 50000 ЕД, хотя и при использовании такой дозы удалось получить беременность всего лишь у 37,5% контрольных самок.

По данным проведенного исследования выявлено, что билатеральная терапия значительно более эффективна у крыс, чем моноорганный, что подтверждается гистологическими исследованиями, исследованиями индекса сперматогенеза, исследованиями гормонов крови и фертильности, а животные, перенесшие билатеральную терапию, имеют в 4,39 раза более высокий репродуктивный потенциал.

Минимальной терапевтической дозой может считаться доза 50000 ЕД, при которой некоторые самцы Wister достигли показателя фертильности и оставили потомство. При этом частота наступления беременностей у самок в этих группах была в 2 раза ниже, чем у животных в группах с дозой 500000 ЕД. Поэтому, использование клеточной терапии в дозе 50000 ЕД способно восстановить частичную фертильность, но более эффективной дозой может считаться 500000 ЕД, так как в послеоперационном периоде животные этих групп демонстрировали индекс фертильности в 4 раза больший, чем в группе с дозой 50000 ЕД. Это свидетельствует о том, что более оптимальной дозой для терапии инфертильности у крыс является доза 500000 ЕД на 1 яичко.

### **7.3 Исследование влияния различных индукторов сперматогенной дифференцировки прогениторных клеток на поведение клеток после их трансплантации**

#### ***7.3.1 Изучение действия индукторов дифференцировки для сингенной, аллогенной и ксеногенной клеточной культуры***

В настоящее время на рынке клеточных технологий отсутствуют препараты, которые могли бы быть использованы для активации предифференцировки стволовых и прогениторных



клеток эмбрионального яичка и мезенхимальных стволовых клеток в клетки, способных восстанавливать фертильность. Тем не менее, учитывая определенные сложности получения обогащенных клеточных культур, возможность индукции мезенхимальных стволовых клеток, полученных из культур костного мозга человека и экспериментальных животных под действием культуральной среды, кондиционированной тканевыми культурами соответствующего генеза, с добавлением различных индукторов, является актуальной задачей.

Такая постановка вопроса обусловлена разной степенью доступности биоматериала для трансплантации, различной выраженностью его эффекта, а также безопасностью материала и его экономическими характеристиками. Благодаря тому, что яичко является иммунопредвигирированным органом, при минимуме иммунных реакций, существует возможность введения в него как сингенного материала (аутологичного костного мозга и его дериватов), аллогенного материала (препаратов фетальных тканей, клеток плаценты), аутологичного, а также культур, полученных из аутопсийного материала.

В данном случае изучение эффективности имплантации клеточных культур, обогащенных стволовыми / прогениторными клетками, а также методов индукционного обогащения, будет способствовать формированию теоретической базы под клиническое применение индукторов префифференцировки.

### ***7.3.2 Методология изучение эффекта введения аутологичных и аллогенных культур клеток, индуцированных стимуляторами А и В***

На этапе низведения яичек в мошонку трансплантируемые культуры *in vitro* обрабатывались стимулятором того или иного типа, после чего вводились инъекционно. Изучение сравнительной эффективности стимуляторов А и В проведено на моделях аутологичной (донор и реципиент – крысы линии Campbell) и аллогенной (донор крыса породной группы Wistar и реципиент – крысы линии Campbell), (всего 8 крыс), которым трансплантации культуры яичка новорожденных в яичко взрослых после низведения при ликвидации двухстороннего крипторхизма. Исследования проводили при помощи маркерного анализа и окраски опытных и контрольных препаратов яичек через 90 дней после терапии обогащенными клеточными культурами.

Было проведено иммуноморфологическое исследование, с использованием моноклональных антител к следующим маркерам:

1. DAZL – ядра сперматогоний до и во время профазы мейоза.

2. DDX4 – примордиальный маркер мужских половых клеток.
3. Stella – маркер половых клеток.

### ***7.3.3 Иммуноморфологическое изучение эффекта введения аутологичных и аллогенных культур клеток, индуцированных стимуляторами А и В***

Результаты иммуноморфологического анализа в экспериментальных группах представлены на рисунках 30-33.

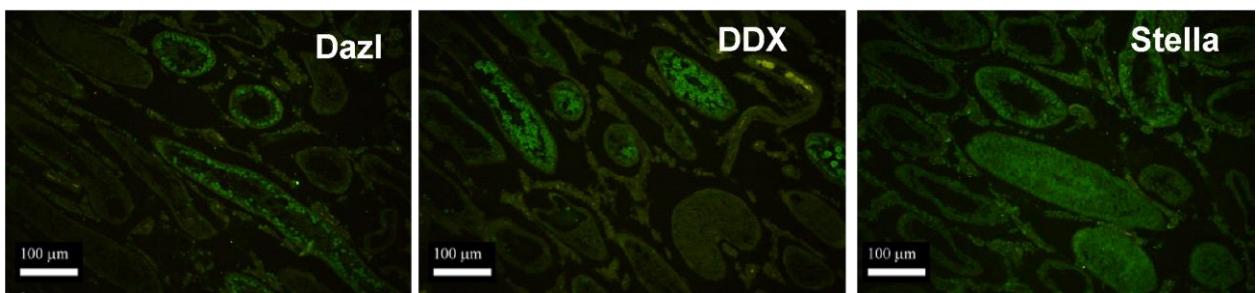


Рисунок 30 – Семенные каналцы крысы Campbell на 60 сутки после терапии культуры аутологичных клеток, обработанных в момент низведения стимулятором А,  $\times 200$

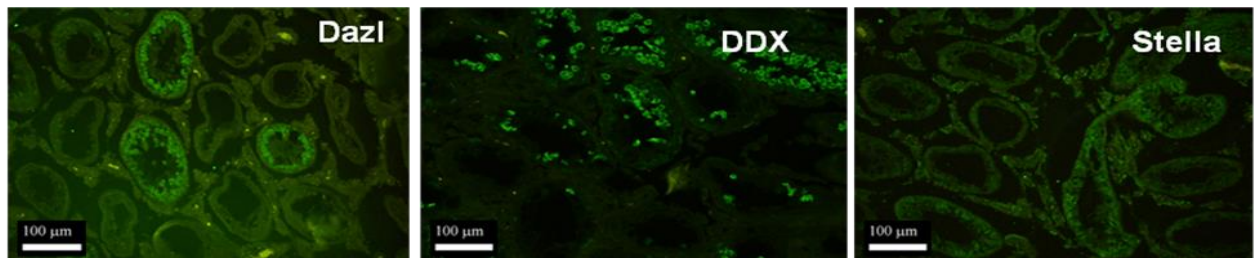


Рисунок 31 – Семенные каналцы крысы Campbell на 60 сутки после трансплантации культуры аллогенных клеток породной группы Wistar, обработанных в момент низведения стимулятором А,  $\times 800$

При обработке трансплантируемых культур стимулятором А в аутологичной (рисунок 32) и аллогенной (рисунок 33) модели были выявлены следующие изменения: В большинстве канальцев было выявлено запустевание, сопровождающееся критическим снижением количества сперматогоний 1 порядка. Отмечались признаки блокады сперматогенеза на ранних стадиях. Индекс сперматогенеза в препаратах данной серии – высокий – более 0,91, что делает

восстановление сперматогенеза в данных семенных канальцах маловероятным и на более поздних сроках наблюдения. Такая закономерность прослеживается при окраске препаратов всеми тремя использованными маркерами.

При обработке стимулятором В к 60 дню наблюдения сперматогенез частично восстанавливается как в аутологичной так и аллогенной модели (рисунки 32, 33), причем количество канальцев с признаками активной прогениторной пролиферации весьма значительное. Число канальцев с полностью утраченными признаками сперматогенеза незначительное. В большинстве канальцев сперматогенез сохранен до сперматогоний 2 порядка, иногда до готовых сперматозоидов.

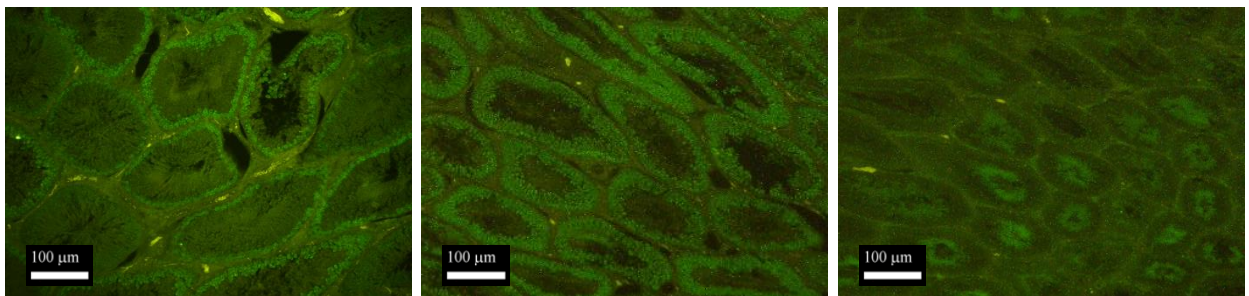


Рисунок 32 – Семенные канальцы крысы Campbell на 60 сутки после терапии культурой аутологичных клеток породной группы Campbell, обработанных в момент низведения стимулятором В,  $\times 800$

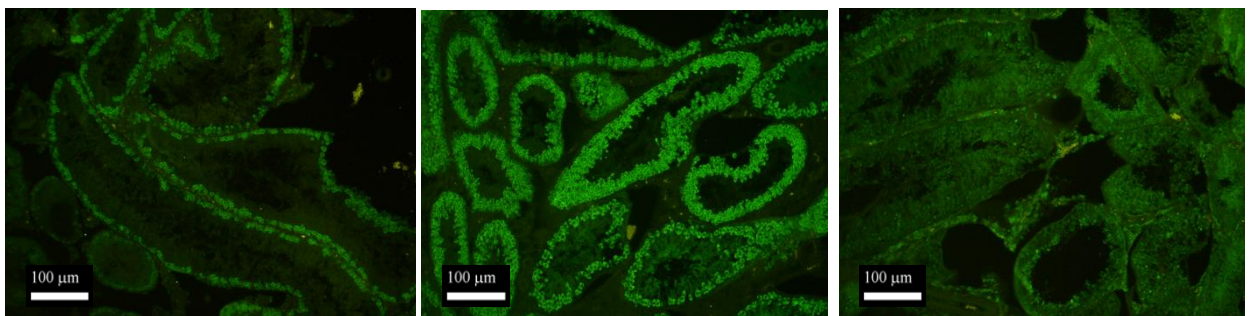


Рисунок 33 – Семенные канальцы крысы Campbell на 60 сутки после терапии культурой аллогенных клеток породной группы Wistar, обработанных в момент низведения стимулятором В

Таким образом, более перспективным и эффективным для индукционной стимуляции клеточной предифференцировки является стимулятор В.

## 7.4 Специфичность маркерной оценки культур, обогащенных стволовыми / прогениторными клетками, которые использованы в работе

### 7.4.1 Маркерный анализ трансформации и дифференцировки сперматогенных стволовых клеток при оценке результатов терапии клеточными культурами ксеногенного происхождения

#### 7.4.1.1 Окраска антителами к DAZL

При окраске антителами к DAZL в группах крыс, получивших терапию культурами ксеногенного происхождения, были выявлены следующие изменения: в большинстве канальцев было выявлено наличие сохранного сперматогенеза, по периферии канальцев выявлены интенсивно окрашенные клетки, экспрессирующие DAZL (рисунок 34). В части канальцев было выявлено запустевание и признаки блокады сперматогенеза на ранних стадиях.

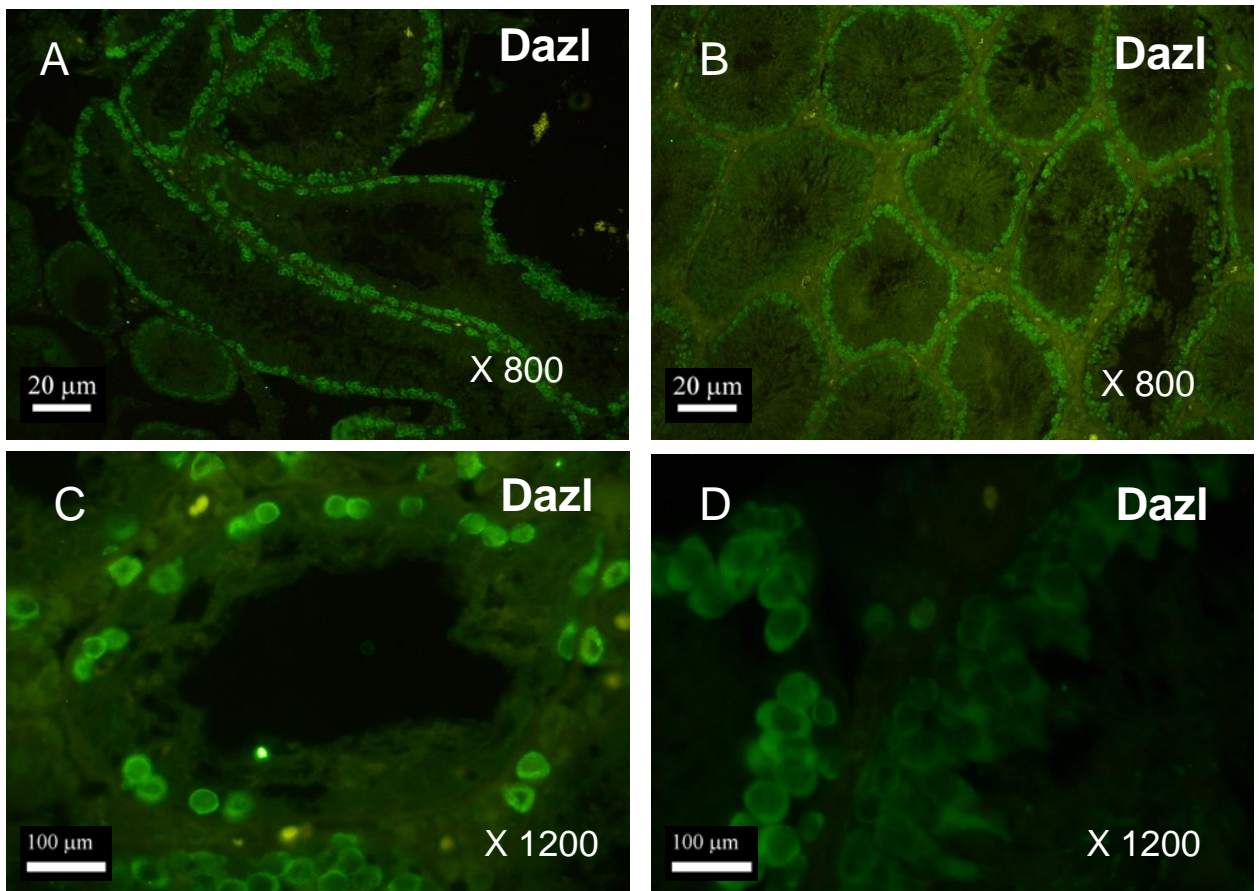


Рисунок 34 – Специфичность красителя DAZL при окраске сперматогенного эпителия крыс Wistar на ранних (A,C) и поздних (B, D) сроках наблюдения

При большем увеличении заметно, что, несмотря на наличие сперматогенных клеток по всему объёму канальцев, прокрашивались только клетки, находящиеся непосредственно у базальной мембраны. Эти клетки являются сперматогониями типа А, из которых Аs (одиночные) являются истинными стволовыми клетками, А рг (спаренные) – прогениторными клетками сперматогенной системы грызунов (рисунок 34, С).

В канальцах было обнаружено окрашивание не только клеток, непосредственно контактирующих с базальной мембраной, но и расположенных на некотором отдалении от неё (рисунок 34, D). Окрашенные клетки формируют линейные структуры, обращённые к просвету канальца. По всей видимости, в данном случае наблюдается окрашивание сперматогоний Аa1 – aligned, и, возможно, происходящих из них более дифференцированных сперматогоний типа А.

По данным О. Lacham-Kaplan (2004), экспрессия DAZL у грызунов начинается в мигрирующих первичных половых клетках, которая сохраняется на протяжении цикла развития сперматогенного эпителия до сперматогоний типа А4 включительно (рисунок 34). Это объясняет наблюдаемое в некоторых препаратах окрашивание клеток, расположенных на отдалении от базальной мембраны, которые являются дифференцированными сперматогониями типа Аa1.

Полученные в эксперименте данные позволяют сделать заключение, что в большинстве окрашенных препаратов DAZL проявил себя как специфичный маркер стволовых и прогениторных сперматогенных клеток, несмотря на то, что в некоторых препаратах часть окраски клеток была менее специфична.

#### *7.4.1.2 Окраска антителами к Stella*

При окраске антителами к Stella в группах крыс, получивших терапию культурами ксеногенного происхождения, были выявлены следующие изменения: в большинстве канальцев в большинстве канальцев было выявлено наличие сохраненного сперматогенеза. В части канальцев было выявлено частичное или полное запустевание и признаки блокады сперматогенеза. Клетки, окрашенные антителами к Stella, располагались преимущественно в центре канальцев, также небольшое количество групп клеток, экспрессирующих Stella, располагалось на базальной мембране (рисунок 35).



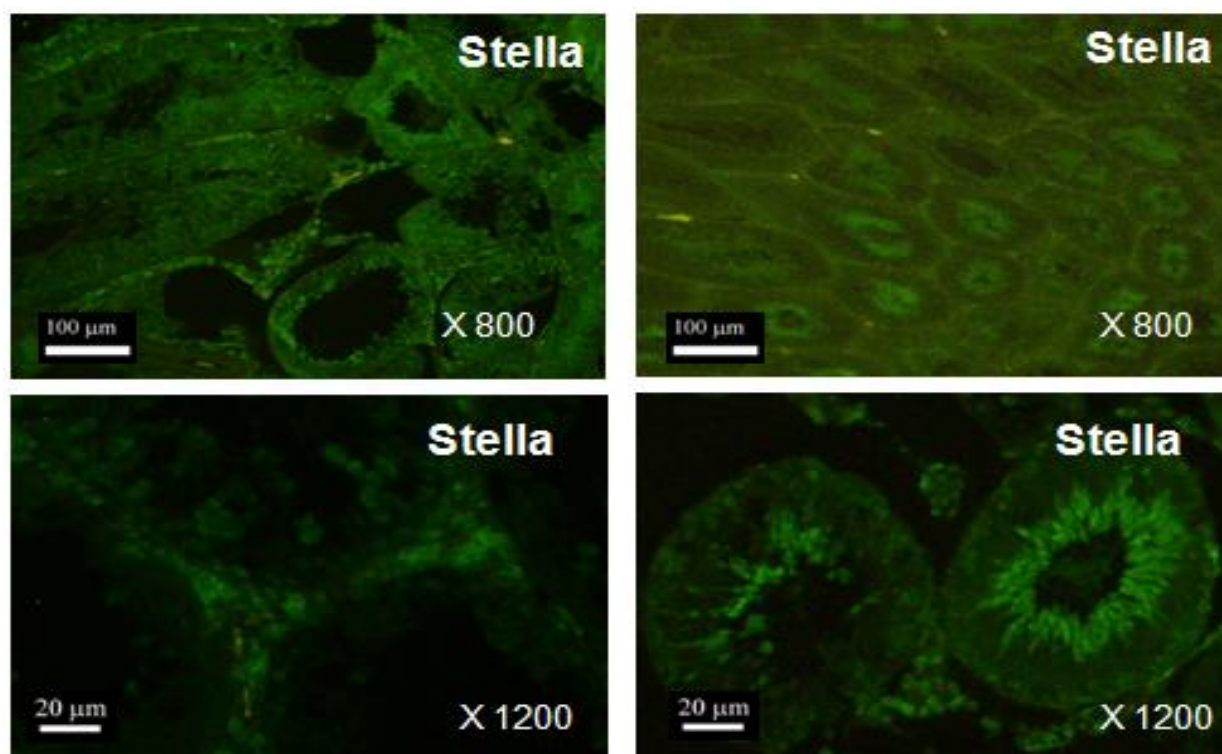


Рисунок 35 – Специфичность красителя Stella при окраске сперматогенного эпителия крыс Wistar на ранних (А, С) и поздних (В, D) сроках наблюдения.,  $\times 200$ ,  $\times 800$

По данным О. Lacham-Karlan (2004) активность маркера Stella возрастает при усилении активности прогениторной дифференцировки ССК и увеличивается по мере дифференцировки ССК до сперматогоний A<sub>1-4</sub>).

По данным проведенного обследования выявлено, что маркер Stella показал хорошую активность при оценке интенсивности процессов дифференцировки ССК и сперматогоний, и может использоваться в качестве маркера при изучении эффектов стимуляционной терапии ССК.

#### 7.4.1.3 Окраска антителами к DDX

При окраске антителами к DDX в группах крыс, получивших терапию культурами ксеногенного происхождения, также было выявлено наличие сохранного сперматогенеза в большинстве канальцев, а также были выявлены интенсивно окрашенные клетки, экспрессирующие DDX, которые располагались преимущественно в центре канальцев (рисунок 36). В части канальцев также было выявлено запустевание и признаки блокады сперматогенеза на ранних стадиях.

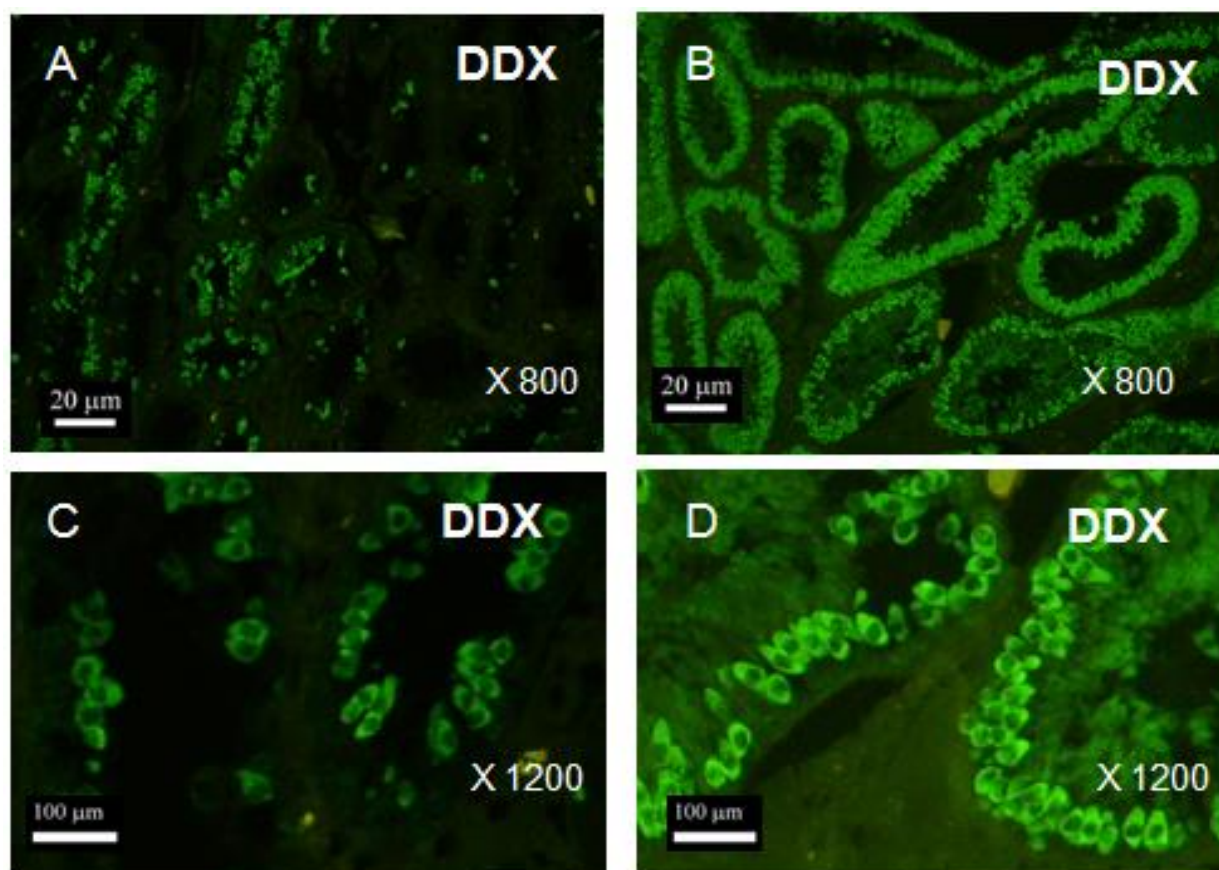


Рисунок 36 – Специфичность красителя DDX при окраске сперматогенного эпителия крыс Wistar на ранних (A, C) и поздних (B, D) сроках наблюдения

По данным маркерного анализа клетки, имеющие свечение к антителам DDX располагались частично на базальной мембране, частично в просвете семенного канальца, причем на поздних сроках наблюдения количество клеток с экспрессией DDX увеличивалось в геометрической прогрессии.

Также следует отметить, что свечение к DDX наблюдается на всем протяжении пролиферативного цикла сперматогоний, начиная от базальной мембраны, где идет трансформация и дифференцировка ССК и до сперматогоний типа А, 1-4 порядка.

Данные О. Lacham-Karlan (2004), подтверждают, что экспрессия DDX при дифференцировке ССК начинается раньше, чем у Stella (рисунок 35), поэтому этот маркер может быть использован для оценки интенсивности начальной (вертикальной) прогениторной дифференцировки ССК.

Таким образом, маркер DDX также является удобным маркером начальной трансформации и прогениторной дифференцировки сперматогенных стволовых клеток.

**7.5 Оценка жизнеспособности клеточных культур *in vivo*, в тканях реципиента, после использования терапии, обогащенной стволовыми и прогениторными клетками, а также контроль их распространения по тканям и органам в течение всего времени жизни культуры**

Данное экспериментальное исследование было проведено на животных породной группы Wistar. Для контроля использовалась терапия культурами клеток яичка и стромы жировой ткани трансгенных мышей несущих ген GFP, в яичко сингенных и аллогенных мышей, а также в яичко крыс, в качестве сравнения ксеновариантного воздействия.

Для определения путей миграции клеток после введения были получены обогащенные культуры от мышей линии C57 Black/6 с введенным трансгеном GFP. Были получены культуры стромы яичка и жировой ткани для дальнейшей интратестикулярной терапии под белочную оболочку яичек мышей линии C57 Black/6 без введенного трансгена, которые перенесли операцию по формированию двухстороннего абдоминального крипторхизма, с экспозицией в течение 3 недель.

Все клетки трансплантируемых культур, полученных из тканей мышей 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 миграции донорских клеточных единиц трансплантата, оценки их жизнеспособности *in vivo*, а также распространения по тканям и органам, и косвенно дает информацию о времени жизни трансплантата.

Примером свечения белка GFP в таких культурах клеток, является рисунок 39 (рисунки 37 и 39), на котором хорошо видно зеленое аутоосвещение клеток стромы семенника трансгенной мыши. Для проведения маркерного анализа клетки были окрашены моноклональными антителами на актин, N-кадгерин, ОКТ-4 и нестин. Результаты маркерного анализа представлены в таблице 41 и на рисунках 38-42.





А – окраска моноклональными антителами против актина; Б – окраска ядерным красителем Хехст 3344; В – совмещение рисунков А и Б).

Рисунок 37 – Культура клеток стромы яичка трансгенной мыши линии C-57 Black/6 несущих ген GFP,  $\times 800$

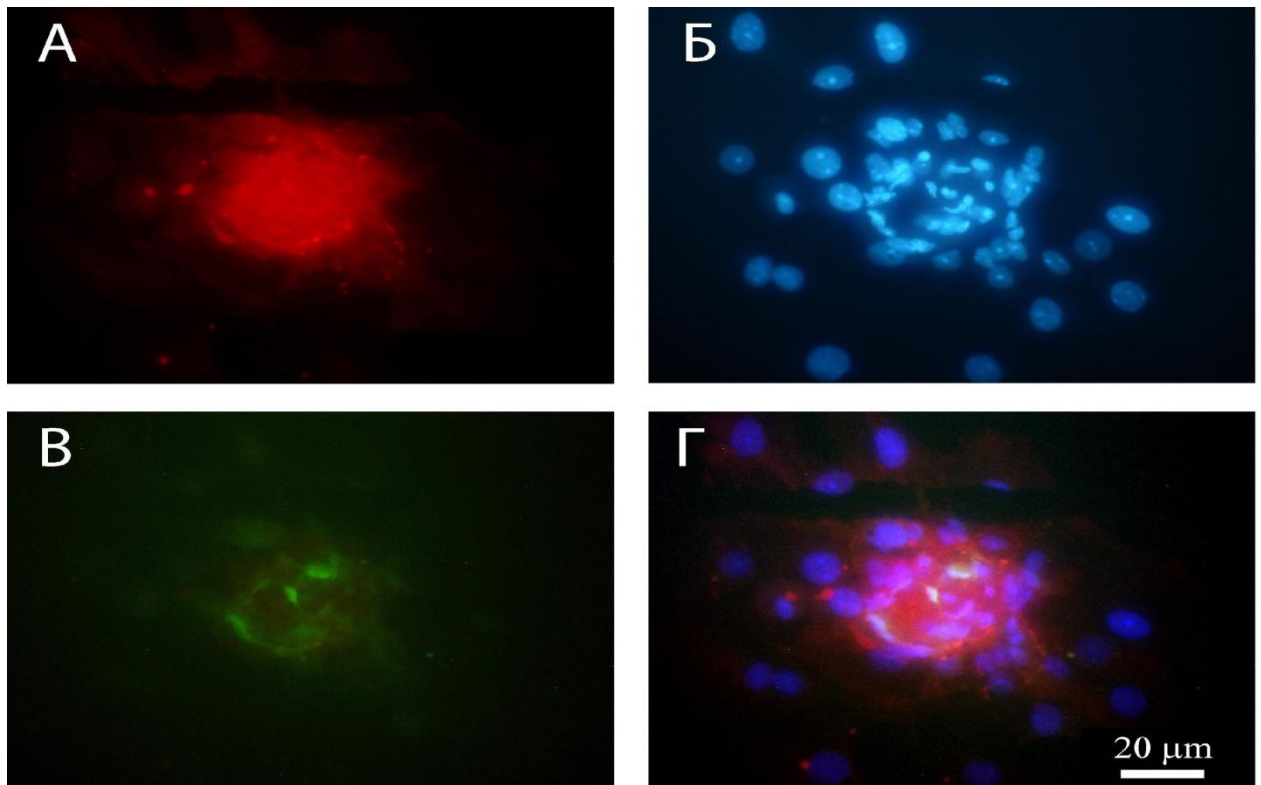
Таблица 41 – Маркерный анализ культуры стромы яичка и жировой ткани

Маркер	Строма яичка	Строма жировой ткани
Актин	Очень редкие одиночные клетки	–
N-cadherin	Очень редкие одиночные клетки	+ цитоплазма большинства клеток
Oct4	Ядра и цитоплазма клеток в островках	Ядра большинства клеток
Nestin	Цитоплазма клеток в островках	–



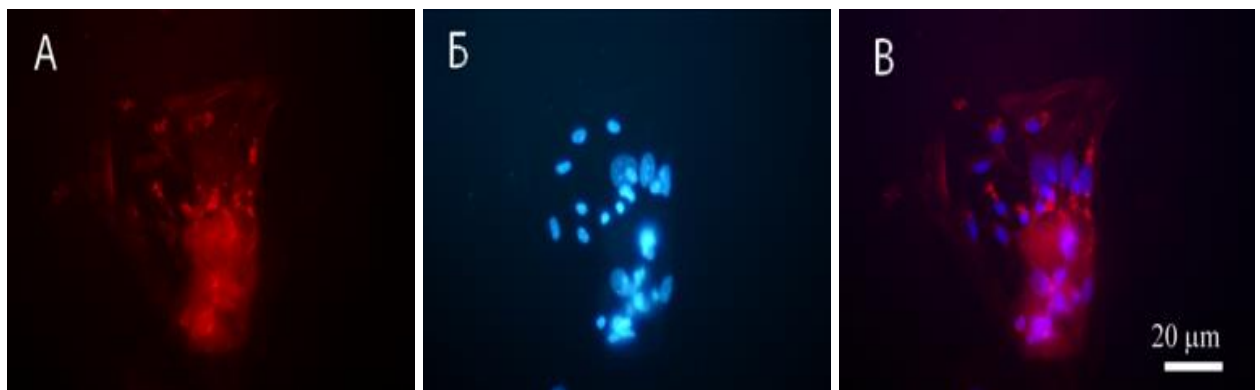
А – окраска моноклональными антителами против N – кадгерина; Б – окраска ядерным красителем Хехст 3344; В – совмещение рисунков А и Б.

Рисунок 38 – Культура клеток стромы яичка трансгенной мыши линии C-57 Black/6 несущих ген GFP



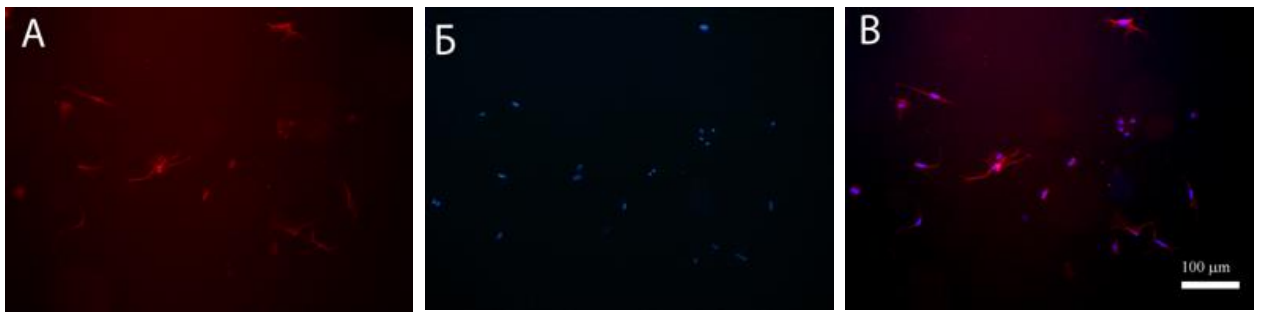
А – окраска моноклональными антителами против Ost4; Б – окраска ядерным красителем Хехст 3344; В – собственное свечение трансгенных клеток; Г – совмещение рисунков А и Б.

Рисунок 39 – Культура клеток стромы яичка трансгенной мыши линии C-57 Black/6 несущих ген GFP. Увеличение  $\times 40$ ,  $\times 1200$



А – окраска моноклональными антителами против вестина;  
Б – окраска ядерным красителем Хехст 3344; В – совмещение рисунков А и Б.

Рисунок 40 – Культура клеток стромы яичка трансгенной мыши линии C-57 Black/6 несущих ген GFP,  $\times 800$



А – окраска моноклональными антителами против N-кадгерина;

Б – окраска ядерным красителем Хехст 3344; В – совмещение рисунков А и Б.

Рисунок 41 – Культура клеток стромы жировой ткани трансгенной мыши линии C-57 Black/6 несущих ген GFP. Увеличение  $\times 10$ ,  $\times 200$



А – окраска моноклональными антителами против Oct4;

Б – окраска ядерным красителем Хехст 3344; В – совмещение рисунков А и Б.

Рисунок 42 – Культура клеток стромы жировой ткани трансгенной мыши линии C-57 Black/6 несущих ген GFP,  $\times 200$

Полученные культуры клеток стромы яичка трансгенных мышей, содержащих ген GFP и окрашенные моноклональными антителами к нестину<sup>+</sup>, N-кадгерину<sup>+</sup>, Oct4<sup>+</sup> и актину<sup>+</sup> дают хорошее свечение в тканях яичек крыс реципиентов. Окраска препаратов семенников крыс после терапии, в которой использовалась культура стромы жировой ткани трансгенных мышей, моноклональными антителами выявила, что N-кадгерин<sup>+</sup> и Oct4<sup>+</sup>, также хорошо определяются в семенниках крыс реципиентов при исследованиях иммуногистохимического контроля.

Из представленного материала видно, что в строме яичка обнаружены все 4 исследуемых маркера, а в строме жировой ткани только 2-N-кадгерин и Oct-4.

Таким образом, культуры, обогащенные стволовыми и прогениторными клетками, полученные из стромы яичка и жировой ткани мышей трансгенной линии C57 Black/6 с введенным геном GFP, могут быть использованы для изучения механизмов восстановления фертильности в сингенном, аллогенном и ксеногенном вариантах.

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

Данный раздел работы выполнен на базе Медицинского научно-образовательного центра (МНОЦ) МГУ имени М.В. Ломоносова и факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Соглашение о субсидии № 14.607.21.0045 от 22 августа 2014 г., уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60714X0045).

Несмотря на то, что клеточная терапия нарушений сперматогенеза в различных вариантах (ксеногенном, аллогенном и аутологичном) дает стабильный клинический эффект и описаны системы маркерного контроля основных этапов физиологического цикла сперматогониальных стволовых клеток (ССК) (маркеры стволовости, преддифференцировки, дифференцировки, пролиферации и т.д.), этот подход связан с различными рисками, включая развитие неоплазии. В то же время для многих типов стволовых и прогениторных клеток показано, что одним из важнейших механизмов реализации их терапевтических эффектов является продукция биоактивных компонентов. Актуальным является и поиск оптимального биосовместимого носителя для транспортировки и обеспечения постепенного высвобождения этих факторов, способствующего привлечению необходимых типов клеток в ключевой орган-мишень. Для обеспечения эффекта депо-освобождения стимулятора в органе мишени в качестве одного из наиболее перспективных бионосителей такого рода был рассмотрен коллаген. Уникальные свойства коллагена позволяют ему образовывать комплексы с биологически активными веществами и пролонгировать их действия по месту применения, а также участвовать в процессах стимуляции регенерации собственных тканей организма. Он в достаточно большом количестве присутствует в органах и тканях, манифестирует слабую антигенность, а также полное отсутствие токсических и канцерогенных свойств. Кроме того, он способен проявлять стабильную устойчивость к тканевым ферментам и обеспечить регулируемую скорость лизиса стимулятора в организме.

Для эффективного восстановления поврежденной ткани чаще всего недостаточно увеличить продукцию только одного из факторов роста – необходимо сочетанное влияние нескольких факторов. Кондиционированная среда, содержащая в своем составе продукты секреции МСК, выделенных из жировой ткани, сама по себе обладает значительным регенеративным потенциалом. Биологические активные вещества, находящиеся в ее составе, способны стимулировать восстановление кровоснабжения и иннервации тканей после

повреждения, способствовать активации эндогенных процессов регенерации за счет дополнительного привлечения стволовых и прогениторных клеток в область повреждения, а также ускорять заживление ожоговых и механических ран, что было доказано на различных моделях *in vitro* и *in vivo*.

В данном разделе диссертационной работы исследовались возможности использования комбинации кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК человека и коллагена I типа для стимуляции репарационных процессов в тканях яичка экспериментальных животных и возможность восстановления сперматогенеза после индуцированного повреждения.

### ***7.6.1 Получение секрета мезенхимальных стромальных стволовых клеток жировой ткани***

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 43, А-Г, концентрации в таблице 42.

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 ( $r=0,46$ ;  $p=0,12$ ).

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.

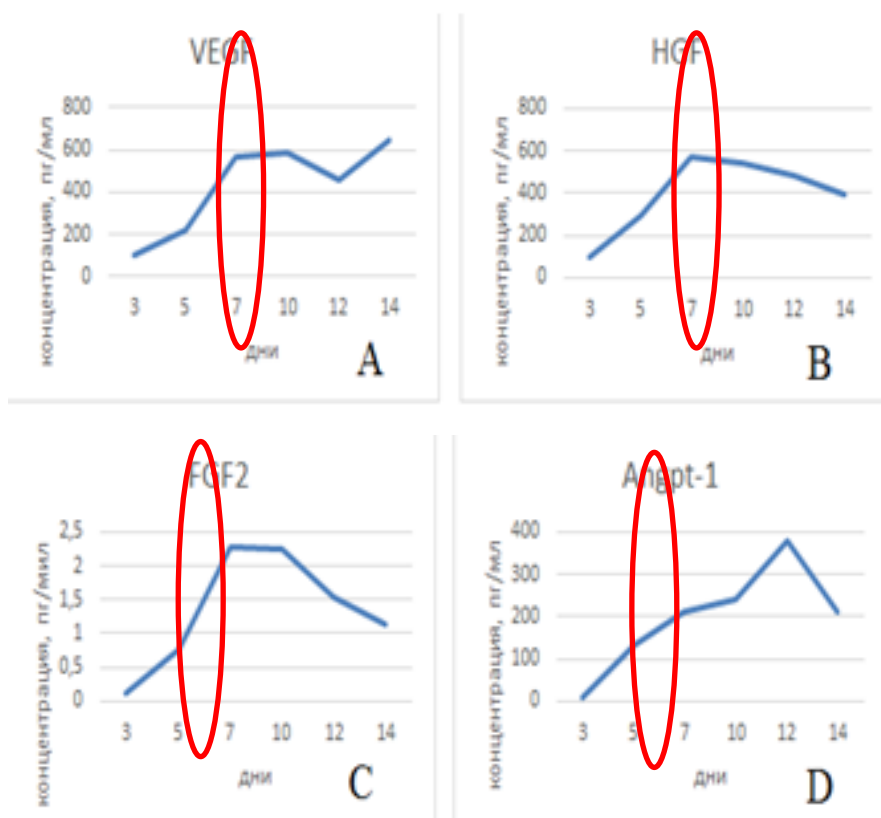


Рисунок 43 – Изменения концентраций основных просперматогенных факторов роста

Таблица 42 – Динамика изменения концентраций 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)

Данный этап работы выполнен на 40 половозрелых крысах-самцах породной группы Wistar, в возрасте 3,5-4,0 месяца, стандартных весовых характеристик, которым выполнялось стандартное моделирование двухстороннего абдоминального крипторхизма в течение 3 недель.

**Проведено 6 серий опытов:**

В 1-й серии, которая считалась контрольной, яички после 2-недельного пребывания в брюшной полости низводили в мошонку и, в дальнейшем, наблюдали, проводя стандартные процедуры контроля.

Во 2-й серии перед низведением яичек под их белочную оболочку вводили 0,1 мл коллагенового геля, содержащего 50 процентную кондиционированную среду, содержащую 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, секретируемых 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 также 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.

### **7.6.2 Результаты**

В модели двухстороннего абдоминального крипторхизма наиболее неприятным осложнением является гипотрофия яичек, которая сопровождается значительной потерей массы органа. По данным проведенного обследования было установлено, что после 2-недельного пребывания в брюшной полости масса яичек уменьшалась в среднем с  $1,98 \pm 0,09$  г до  $0,82 \pm 0,06$  г ( $p < 0,001$ ) (рисунок 44).

Интересно, что в группах контроля (контроль, DMEM, и концентрированная 50% среда с факторами роста мезенхимальных клеток жировой ткани) через 1 месяц после низведения яичек в мошонку масса эктомированных органов практически не изменилась. В группах, где животные перенесли введение концентрированной КС (100%) и мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) в составе геля и без него значительно возросла, в среднем до 1,05-1,1 г (диаграмма 28).



Рисунок 44 – Внешний вид тестикул после орхифуникулоэктомии, нормальное (слева) и крипторхированное (справа)

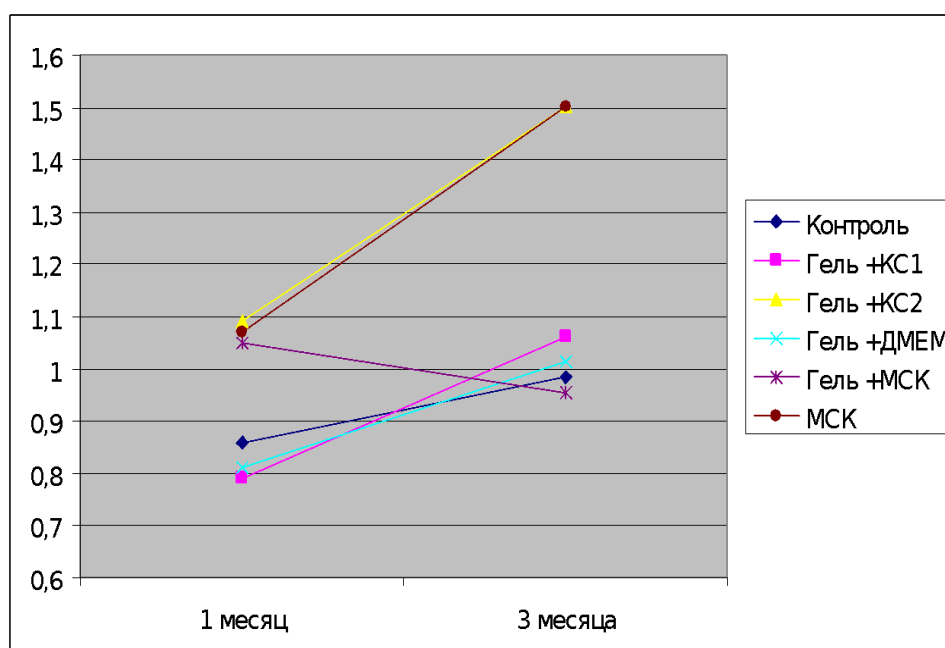


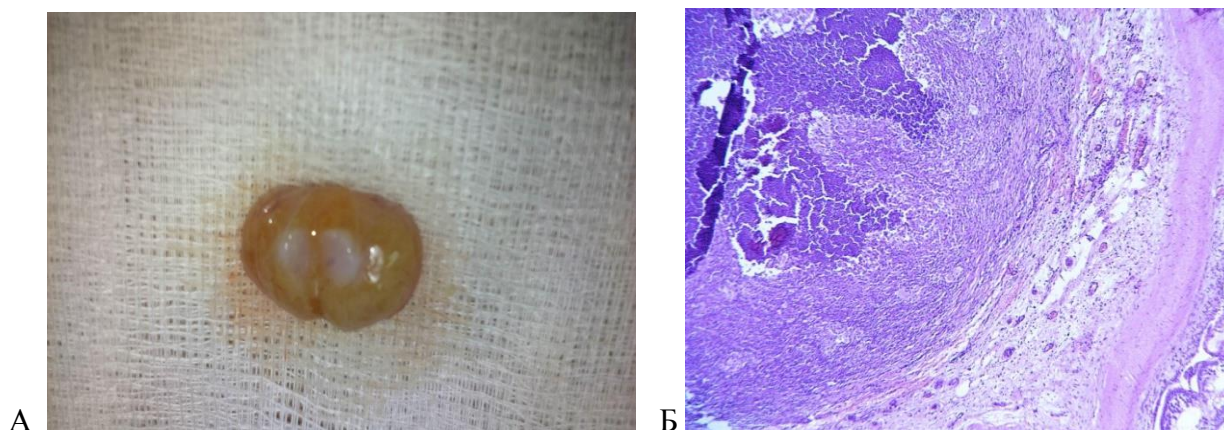
Диаграмма 28 – Изменения массы оперированных яичек после их низведения в мошонку в различных сериях

При контрольном исследовании через 3 месяца после опускания яичек в мошонку, их масса в сериях 1, 2 и 4 незначительно увеличивалась, и различия с данными полученными через 1 месяц статистически незначимы, тогда как в сериях 3, 5 и 6 (гель с концентрированной КС (100%) и МСК масса яичек достоверно продолжала увеличиваться, ( $p < 0,05$ ).



Неожиданные результаты получены в серии гель+МСК, где через 3 месяца отмечено уменьшение массы органов. Объяснение этому факту было получено при гистологическом исследовании яичек этой серии.

Во всех препаратах в группе с 3-месячным сроком наблюдения выявлено наличие в ткани яичка соединительнотканной гранулемы, занимающей значительную часть объема органа, состоящей из массы гистиоцитов, окружающей центральную базофильную зону (рисунок 45).



А – внешний вид; Б – гистологическая картина.

Рисунок 45 – Гистиоцитарная гранулема в ткани яичка животного с индуцированным крипторхизмом через 3 месяца после введения коллагенового геля с МСК ЖТ и низведения в мошонку (гематоксилин и эозин, ув.  $\times 200$ )

Вокруг гранулемы формировалась массивная соединительнотканная капсула, а прилежащие семенные канальцы были в состоянии выраженной атрофии. То есть, уменьшение массы органа, по-видимому, было связано с замещением его паренхимы соединительной тканью и вызванной давлением растущей гранулемы атрофии прилежащих семенных канальцев.

При анализе морфологической картины тканей семенников экспериментальных животных через 1 месяц после возврата яичек в мошонку было установлено, что в контрольной серии 1 наблюдались значительные нарушения структуры с развитием блока созревания сперматозоидов на самых ранних стадиях. При этом темные сперматогонии (Adark) выявлялись в 60% случаев, а более зрелые сперматогонии Б и сперматоциты 1-го порядка обнаруживались только в 20% препаратах.

Фактически был получен арест сперматогенеза на уровне сперматогоний 1 порядка, так как более зрелые формы (сперматоциты 2 порядка, сперматозоиды) во всех случаях

отсутствовали (таблица 43). 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.

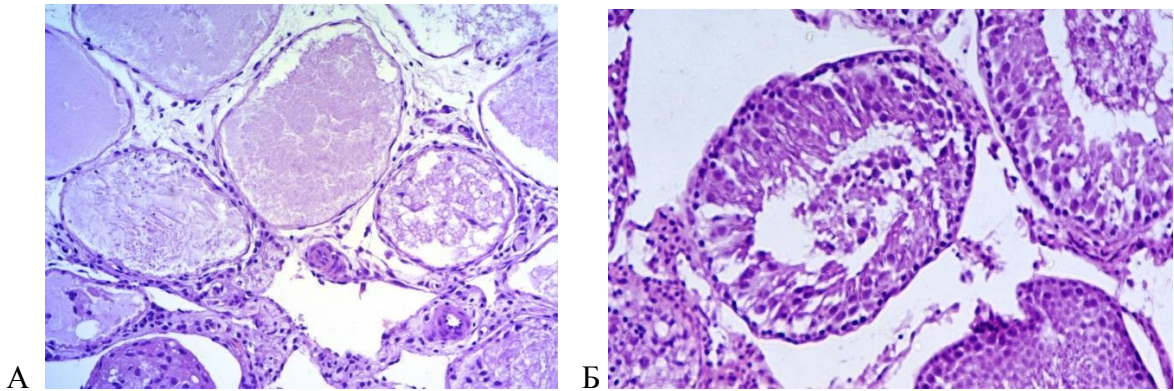
Таблица 43 – Частота выявления различных стадий созревания сперматозоидов в исследуемых сериях через 1 месяц после их низведения (кол-во животных с признаком/кол-во животных в группе)

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
DMEM-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

Положительные изменения функционального и морфологического состояния яичка отмечены 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 сериях был выявлен полностью завершённый цикл сперматогенеза до стадии зрелых сперматозоидов или в части опытов (3-я серия) или во всех экспериментах (5-я и 6-я серии).

В тех опытах, в которых вводили среду ДМЕМ (4-я серия), также отмечено некоторое улучшение сперматогенеза, но менее выраженное. В этой серии блок сперматогенеза развивался на уровне сперматоцитов 1-го или 2-го порядка.

Согласно представленным в таблице 43 данным, в большинстве канальцев у животных 1 и 2 серий было выявлено их резкое обеднение всеми видами клеток (рисунок 46, А). В сериях 3, 5 и 6 клеточная популяция в семенных канальцах в значительной степени восстанавливалась. Наиболее заметно это было при подсчете sustentоцитов, а также стволовых / прогениторных клеток, преимущественно сперматогоний А, а также при выявлении более дифференцированных клеточных форм, вплоть до зрелых сперматозоидов (рисунок 46, Б).



А – Представлены поврежденные семенные канальцы с признаками атрофии, через 1 месяц после низведения (контрольная серия); Б – представлены канальцы с признаками сперматогенеза до конечных форм через 1 месяц после опущения яичек в мошонку с введением КС МСК ЖТ.

Рисунок 46 – Использовалась окраска гематоксилином и эозином, ув.  $\times 200$  и  $\times 400$  соответственно

В серии 1 (контроль) большинство семенных канальцев было полностью лишено сперматогенного эпителиального слоя. В этой группе количество атрофичных канальцев, в том числе спавшихся или заполненных гомогенным эозинофильным содержимым, составило  $63,24 \pm 5,16$  канальцев в поле зрения (ув.  $\times 400$ ). В 4 серии (среда DMEM) общее количество поврежденных и атрофичных канальцев составляло –  $64,26 \pm 3,15$ . В сериях 3, 5 и 6 с введением геля и кондиционированными средами (КС) разных концентраций, геля с МСК и СК, поврежденных канальцев с признаками атрофии было гораздо меньше –  $7,28 \pm 0,26$ ,  $3,18 \pm 0,24$ , 0 и  $34,11 \pm 0,15$  канальцев соответственно.

При контрольном обследовании через 3 месяца после низведения крипторхированных яичек во всех сериях (даже в контрольных) выявлены признаки некоторого улучшения сперматогенеза, при этом популяция светлых и темных сперматогоний А в большинстве семенных канальцев практически полностью восстановилась. Интересно, что в контрольной серии при анализе встречались единичные локусы с относительно сохранным фрагментарным сперматогенезом, завершенным до сперматозоидов, но, в большинстве случаев, он был арестован на уровне сперматоцитов 1-го и 2-го порядка (таблица 44). В сериях животных, которым вводили гель с неконцентрированной КС и DMEM состояние сперматогенеза не отличалась от контроля (серия 1). В опытах с концентрированной КС (доза 2) и МСК выявляли завершенный 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 (таблица 45).

Таблица 44 – Частота выявления различных стадий созревания сперматозоидов через 3 месяца после возврата в мошонку (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)	6/6	6/6	4/6	2/6	1/6	1/6
КС доза 1 (2-я серия)	8/8	8/8	7/8	4/8	4/8	0/8
КС доза 2 (3-я серия)	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	4/6
DMEM-LG (4-я серия)	6/6	6/6	6/6	4/6	1/6	0/6
Гель+МСК (5-я серия)	–	–	–	–	–	–
МСК (6 серия)	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6

Таблица 45 – Количественная характеристика субпопуляции клеток сперматогенного эпителия через 1 месяц после опущения яичек в мошонку (клеток в 1 мкм<sup>2</sup>)

Серии	Сперматогонии А светлые	Сперматогонии А темные	Сперматогонии Б	Сперматоциты 1 порядка	Сперматоциты 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 **
DMEM-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.

Данные количественных характеристик семенных канальцев представлено в таблице 46. При этом статистически достоверных различий между количеством светлых и темных сперматогоний А при анализе между всеми сериями выявить не удалось. Тем не менее следует отметить, что степень восстановления сперматогоний класса Б в контрольной серии оказалась статистически достоверно более низкая, чем в опытных сериях.

Таблица 46 – Количественная характеристика субпопуляции клеток сперматогенного эпителия через 3 месяца после возврата яичек в мошонку (клеток в 1 мкм<sup>2</sup>)

Серии	Сперматогонии А светлые	Сперматогонии А темные	Сперматогонии Б	Сперматоциты 1 порядка	Сперматоциты 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 *
ДМЕМ-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.						

Кроме того, в контроле в целом было выявлено гораздо меньше более дифференцированных форм, чем в других сериях, за исключением опытов с ДМЕМ. Следует отметить, что введение геля с ДМЕМ стимулировало восстановление сперматогенеза по сравнению с контролем до уровня сперматогоний Б, но в дальнейшем созревание клеток ускорялось не столь значительно и не имело статистической значимости.

В связи с наличием 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. Следует отметить, что

некоторыми репаративными возможностями среда DMEM все же обладает, так как через 3 месяца при контрольном обследовании было выявлено, что количество атрофичных канальцев в этой серии составило  $52,12 \pm 2,19$ , в то время как в контроле –  $75,26 \pm 6,17$  канальцев на единицу условной площади препарата.

В остальных сериях количество канальцев с признаками атрофии, а также спавшихся или заполненных гомогенным эозинофильным содержимым продолжало снижаться, составив в серии гель+КС доза 1  $0,03 \pm 0,01$ , КС доза 2 –  $0,78 \pm 0,13$  и МСК –  $6,13 \pm 0,52$  канальцев.

При анализе функционального состояния придатков яичек после перенесенного трехнедельного крипторхизма было выявлено, что у здоровых крыс из придатка нам удалось выделить в среднем  $61,375$  ( $51,187$ ;  $71,562$ ) тысяч клеток на 1 придаток, причем в среднем  $693\ 750$  ( $534\ 375$ ;  $853\ 125$ ) сперматозоидов сохраняли подвижность после выделения.

Через 1 месяц после возврата крипторхированных яичек в мошонку во всех сериях было отмечено резкое уменьшение общего количества, а также количества подвижных сперматозоидов на 88-100%. Тем не менее, в сериях 2 и 3, а также в серии 5 было выявлено некоторое увеличение общего количества сперматозоидов по сравнению с контрольными сериями, тогда как в отношении подвижных клеток существенных различий обнаружено не было.

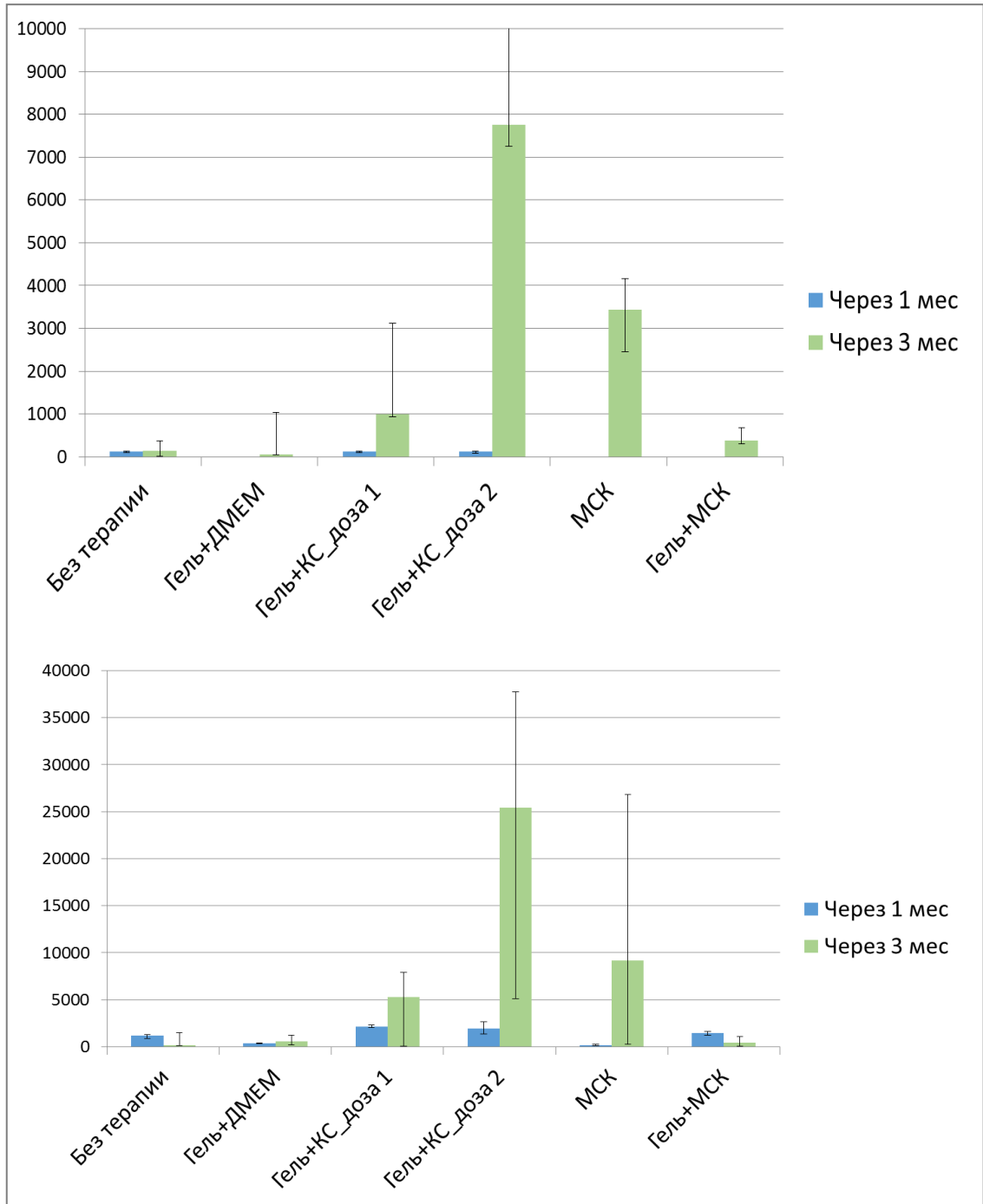
Через 3 месяца после возврата яичек в мошонку отмечено значительное увеличение общего количества и количества подвижных сперматозоидов в сериях 2, 3 и 6, но наибольший прирост этих показателей был получен в серии с использованием концентрированной КС (серия 3).

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%.

У животных 6 серии (МСК) по сравнению с предыдущим контрольным сроком было отмечено повышение общего количества сперматозоидов, в среднем до 9 156 000 сперматозоидов, причем 1 656 000 относились к подвижной фракции (18,1%). Этот факт свидетельствует о серьезном клиническом эффекте, который способна оказывать культура МСК на активность репаративных процессов при повреждениях сперматогенеза (рисунок 47).

Экспериментальное моделирование инфертильности у животных приводит к стойким нарушениям, развивающимся в течение 2 недель и заключающимся в выраженном блоке сперматогенеза, снижении общего количества клеток Сертоли, инфертильности, гипогонадизму

и другим явлениям, которые возникают на фоне выраженного локального иммунного воспаления, сопровождающегося очаговой и диффузной лимфоцитарной инфильтрацией, лимфостазом, признаками атрофии и склероза функционального сперматогенного эпителия.



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

Рисунок 47 – Результаты анализа общего количества сперматозоидов (А) и количества подвижных сперматозоидов (Б), выделенных из придатков яичек животных исследуемых серий (тыс. на 1 придаток). Данные представлены в виде медианы (25-, 75-процентили)

Такое моделирование дает стойкий и выраженный клинический эффект, преодоление которого является непростой задачей. Эти данные коррелируют с изменениями, полученными другими авторами, которые сообщают о выраженных нарушениях сперматогенеза у пациентов с крипторхизмом, семенные каналцы которых имеют арест сперматогенеза на уровне образования сперматогоний 1 порядка, причем большинство каналцев имеют только клетки Сертоли [25].

Использование факторов роста для стимуляции процессов заживления и регуляции ремоделирования тканей является активно развивающимся направлением регенеративной медицины. Для нормального жизненного цикла сперматогенных стволовых клеток наиболее важное значение имеют такие факторы, как GDNF – нейротрофический фактор из глиальных клеток, фактор роста фибробластов (FGF-2) и ряд других. В частности, активация процессов дифференцировки ССК невозможна без локального увеличения повышения секреции FGF-2 и GDNF, а также подавлении фактора KITLG. В работах, посвященных восстановлению сперматогенеза, показано, что введение фактора роста эндотелия сосудов (VEGF165) на коллагеновом (гелевом) носителе не оказывает стимулирующий эффект на процессы образования семенных каналцев или появление новых кровеносных сосудов, но способно увеличивать долю уже образованных каналцев, имеющих признаки начального сперматогенеза, что косвенно подтверждает защитное действие VEGF по отношению к сперматогониальным стволовым клеткам [69].

Таким образом, введение под белочную оболочку яичек обогащенной клеточной культуры МСК ЖТ или кондиционированной среды этих клеток с концентрированными факторами роста на коллагеновом геле, успешно стимулирует процессы репарации сперматогенеза на животной крипторхической модели. При этом наиболее клинически значимый эффект был получен 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 [14]. Интересно, что при введении неконцентрированной КС МСК ЖТ, несмотря на уровневый блок, количество сперматозоидов 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.

Ранее нами и другими исследователями был подробно изучен секретом МСК человека: эти клетки секретируют широкий спектр факторов роста и цитокинов, включая ключевые для поддержания жизнедеятельности ССК факторы GDNF [27], VEGF, FGF-2 и другие [19, 187], с экспериментально определенной максимальной концентрацией факторов роста на 7 сутки культивирования клеточной культуры. По-видимому, наблюдаемые нами эффекты экспериментальной терапии в отношении восстановления функции яичек и положительных результатов гистоморфологического исследования обусловлены паракриной активностью МСК. Помимо факторов роста и других растворимых молекул, МСК секретируют различные типы внеклеточных везикул, которые также могут при введении в яичко проникать в семенные каналцы и интерстиций, взаимодействовать с ССК и поддерживающими клетками и передавать к ним белки, регуляторные РНК и другие биоактивные компоненты, стимулируя процессы восстановления сперматогенеза. Однако, роль внеклеточных везикул в сперматогенезе изучена слабо, хотя и показано их влияние на регуляцию созревания сперматозоидов [129].

Следует отметить, что при введении МСК ЖТ в составе коллагенового геля у 50% экспериментальных животных через 3 месяца на фоне потери массы яичек было выявлено развитие специфической гистиоцитарной гранулемы, вызывающей локальное замещение семенных каналцев в условиях сопутствующей значительной ишемии ткани, которое, по всей видимости, связано с тем, что коллагеновый носитель сыграл роль своеобразной клеточной ниши для МСК [43] и, после пространственной ориентировки клеток, репарационный потенциал МСК был ориентирован на формирование гранулематозной ткани. Даже у остальных животных этой серии, у которых не развились гранулемы, через 3 месяца наблюдения было выявлено, что большинство семенных каналцев 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.

## Глава 8

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мужское бесплодие у человека определяется как неспособность оплодотворения здоровой женщины, при отсутствии использования методов предохранения в течение 12 месяцев и более. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определила бесплодие как неспособность зачать ребенка после незащищенных регулярных половых контактов в течение не менее 12 месяцев [176]. Проблема является весьма распространенной и, по меньшей мере 30 миллионов мужчин во всем мире страдают от бесплодия, причем наибольшая распространенность приходится на Африку и Восточную Европу, хотя статистические данные могут существенно различаться [64]. Бесплодие считается одной из основных проблем со здоровьем, влияющей на жизнь пары в репродуктивном возрасте, причем распространенность стандартизированного по возрасту бесплодия увеличивается на 0,370% у женщин и на 0,291% у мужчин каждый год в период с 1990 по 2017 год [95]. Мужское бесплодие связано в большей степени с социальными, чем с физиологическими или экономическими трудностями, поэтому раннее выявление проблемы и ее правильное лечение чрезвычайно важны [190].

В нашем исследовании мужской фактор инфертильности был выявлен 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%). Это свидетельствует о том, что роль мужского фактора, как причина отсутствия наступления спонтанной беременности, часто является недооцененной, хотя она превышает 50%. Эти данные подтверждаются международными исследованиями, которые свидетельствуют о более значимой роли мужского фактора в формировании и течении беременности чем принято считать [95].

Кроме того известно, что вследствие ряда причин, таких как высокий уровень фрагментации ДНК, изменения в структуре протаминовых и гистоновых белков, нарушения ультраструктуры сперматозоида и высокий уровень окислительного стресса, мужской фактор бесплодия является причиной прерывания до 80% всех беременностей на сроке до 6 недель [2].

При проведении анализа результатов лечения нарушений сперматогенеза и оценки эффективности процедур ВРТ, обусловленных известной причиной, в сравнении с идиопатическим вариантом (n=96, 32,8%) было выявлено, что в группе пациентов с известной причиной после двух полных циклов ЭКО (ICSI) удалось суммарно добиться еще 41 беременности (42,7%), в то время как в 57,2% случаев добиться беременности не удалось.

При лечении инфертильности, вызванной известной причиной удалось добиться беременности в 113 случаях (57,7%). Это свидетельствует, что, несмотря на значительное влияние сопутствующих заболеваний на вероятность успешного зачатия, лечение известных факторов чаще приводит к успешному финалу, чем лечение идиопатического варианта.

Роль инфекционного фактора в этиологии мужского бесплодия чрезвычайно значима, причем даже санация эякулята не позволяет в должной мере рассчитывать на благоприятный прогноз в получении беременности. Встречаются сообщения, в которых сообщается о том, что сами лейкоциты способны создавать условия по поддержанию мощного окислительного стресса, влияющего на сперматозоиды, который в 4 раза более мощный, чем обычный фоновый стресс [32, 74]. После лечения инфекций, передающихся половым путем, а также использования 2 протоколов ЭКО (ICSI) удалось добиться беременности всего лишь в 33,3% случаев. У 80 пар добиться беременности не удалось. По всей видимости, для этих пар нужно большее количество попыток ЭКО (ICSI), либо другие методы лечения. Снижение активности воспаления в спермоплазме и секрете органов репродуктивной системы также не в полной мере способно обеспечить эффективное преодоление мужского фактора инфертильности, причем комбинированная и консервативная терапия оказались эффективными в 9,1% случаев, а использование протоколов ВРТ обеспечило успех в 32,6% случаев. Таким образом, риск неудачи получения беременности у пар с мужским фактором и сопутствующими воспалительными заболеваниями органов репродуктивной системы составляет от 66,7 до 67,4%. Тем не менее, все пациенты, имеющие признаки воспаления, в обязательном порядке должны быть санированы, чтобы сохранить надежду на благополучный исход.

Оперативное лечение варикоцеле также способно повысить шансы на успешное получение беременности, но, согласно некоторым данным, просперматогенный стимулирующий эффект сохраняется достаточно ограниченное время, от 6 до 12 месяцев максимально [170]. В нашем наблюдении, несмотря на нормализацию сперматологической картины у 40,4% пациентов, удалось добиться всего 7 беременностей. Дополнительное использование 2 протоколов ВРТ существенно увеличило эффективность консервативного лечения в этой группе, до 50% (n=21).

Лечение иммунного фактора при определенных условиях способно нормализовать сперматологическую картину у 17,4% пациентов, при этом обеспечив появление всего двух беременностей (8,7%). Использование ВРТ позволило увеличить количество успешных исходов до 52,1%.

Интересно, что только при некоторых формах инфертильности, обусловленных эндокринным фактором, возможно рассчитывать на успешное решение проблемы мужского бесплодия. Использование консервативной терапии возможно при следующих заболеваниях:

гипогонадотропном гипогонадизме, который встречается, например, при синдроме Каллмана, при идиопатическом гипогонадотропном гипогонадизме, при приобретенной форме, возникающей на фоне передозировки андрогенов, а также при врожденном или приобретенном гипопитуитаризме (гипоталамо-гипофизарной недостаточности). При таких формах неплохой эффект может быть получен с использованием человеческого гонадотропина, в комбинации с рекомбинантным ФСГ или гонадотропин-рилизинг-гормоном. В нашем наблюдении консервативная терапия успеха не имела, но использование сперматозоидов, полученных в рамках проведения 2 протоколов ВРТ позволило добиться 5 беременностей, что позволило прогнозировать преодоление infertility при эндокринных расстройствах у 41,6% пациентов. При других вариантах эндокринопатий, таких как синдром Клайнфельтера, Сертоли клеточном синдроме или синдроме Райфенштайна преодоление мужского фактора infertility возможно только с использованием возможностей ВРТ (ЭКО-ИКСИ).

При тяжелых нарушениях сперматогенеза, таких как азооспермия или стойкая тератозооспермия высокой степени, эффективность консервативной терапии невысока. При тератозооспермии у 13 пациентов она оказалась успешной, улучшила показатели спермограммы и привела к возникновению у партнерш 5 беременностей (6,75%), а использование отобранных в ходе проведения циклов ВРТ сперматозоидов для ИКСИ позволило добиться успеха еще в 17 случаев, таким образом увеличив эффективность лечения до 37,9% пациентов. К сожалению, в 36 случаях (62,0%) обеспечить беременность парам с тератозооспермией даже после двух полных циклов ЭКО (ICSI) не удалось и этим парам нужно либо продолжать тактику использования вспомогательных репродуктивных технологий, либо искать другой альтернативный источник лечения тератозооспермии. Терапия пациентам с азооспермией не проводилась и они сразу отправлялись на MicroTESE, причем сперматозоиды были найдены у 10 пациентов (37,03%) из 27, в том числе у 3 пациентов со структурами семявыносящих протоков.

Следует отметить, что использование двух циклов ВРТ – ЭКО (ICSI) с донорским материалом оказалось лишь частично эффективным. При работах со сперматозоидами, полученными при микроTESE (n=10), при использовании собственного и донорского материала у пациентов с азооспермией, суммарно было получено 5 беременностей (18,5%). В 22 случаях (81,4%) добиться беременности не удалось, по всей видимости отсутствие беременностей было связано с неизвестными или непреодолимыми причинами.

Таким образом, суммарная эффективность комплексной консервативной терапии во всех группах 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 (45,89%) у супружеских пар в исследуемых группах, инфертильных по мужскому фактору, а эффективность 1 попытки ЭКО (ICSI) в среднем составила 21,08%, что является средним показателем для 1 попытки лечения бесплодия пар инфертильных по мужскому фактору [39].

Современные методы лечения мужской инфертильности оказались неэффективными у 158 пар (54,1%), и, несмотря на наличие здоровых партнерш и все принимаемые меры, получить беременности не удалось. Таким образом, у каждого второго пациента (54,1%) с мужским бесплодием современное высокотехнологичное и дорогостоящее лечение оказалось неэффективным. Этим пациентам, по всей видимости, нужно либо продолжать дальнейшее участие в программах ЭКО, но, сколько еще потребуются попыток для успешного наступления беременности, неизвестно. Либо им нужно предлагать другие альтернативные методы лечения, например, терапию обогащенными клеточными культурами с факторами роста или матричный клеточный прайминг.

Сперматогенез млекопитающих представляет собой высокопродуктивный и тщательно координированный процесс, который подразделяется на три последовательные фазы: пролиферативную фазу (активация и преддифференцировка сперматогоний), в которой клетки подвергаются непрерывным последовательным делениям, мейотическую фазу (формирование сперматоцитов), в которой происходит рекомбинация генетического материала, и фазу дифференцировки, в которой сперматиды превращаются в сперматозоиды. Высокая продуктивность сперматогенеза обусловлена в первую очередь постоянной пролиферацией сперматогоний, причем пожизненное поддержание сперматогенеза зависит от биологической компетентности чрезвычайно редких сперматогониальных стволовых клеток (SSC), которые способны к самообновлению и производству дочерних клеток для образования конечных форм – сперматозоидов.

Экспериментальная терапия обогащенными клеточными культурами в семенных канальцах бесплодных самцов-реципиентов, была впервые описана на мышах в 1994 г., в рамках выполнения работ по идентификации сперматогониальных стволовых клеток (ССК) и оценки их биологической функции [45]. При этом было выявлено, что при введении донорских тестикулярных клеток от фертильных животных в просвет семенных канальцев бесплодного самца-реципиента, часть донорских зародышевых клеток мигрирует к периферии семенных канальцев, и, проходя через плотное соединение клеток Сертоли, которые образуют гемато-тестикулярный барьер, достигают базальной мембраны, где формируются первичные условия формирования клеточной «ниши». При интраканальцевом введении клеточной культуры

ее элементы достигают базальной мембраны к 7 суткам. В условиях клеточной «ниши» донорские зародышевые клетки колонизируют базальную мембрану семенных канальцев реципиента и запускают процессы вертикальной дифференцировки, репарируя сперматогенез [10]. Через 2 недели появляются распространяющиеся взаимосвязанные сперматогонии, что указывает на то, что донорские клетки начинают пролиферировать латерально на базальной мембране. Примерно через 1 месяц после трансплантации донорские сперматоциты появляются в адлюминальном отделе семенных канальцев. К 2 месяцам после трансплантации семенные канальцы реципиента заполняются донорскими половыми клетками, и можно идентифицировать донорские сперматозоиды. Таким образом, сперматозоиды, полученные из донорских клеток, могут быть выявлены на мышинной модели уже через 2 месяца после трансплантации. Сперматозоиды, полученные от донора (в рамках пары донор – реципиент, крыса – мышь), морфологически нормальны и способны оплодотворять яйцеклетки, что приводит к производству фертильного потомства, несущего донорский мужской гаплотип. Что подтверждает функциональную пригодность донорских сперматозоидов. Кроме того, восстановленный сперматогенез продолжается в течение оставшейся жизни самца-реципиента [122].

Если на уровне мышь-крыса стоволовые клетки могут быть взаимозаменяемы, то на уровне высших приматов эти данные не подтверждаются, а в литературе сообщается о единичных наблюдениях по получению потомства у инфертильных высших приматов и человека [139, 145]. Согласно данным I. Dobrinski et al. (2006), чем дальше эволюционные межвидовые различия при клеточной терапии в ксеногенном варианте, тем на более ранней стадии блокируется сперматогенез.

Для эффективной активации репаративных процессов большое значение имеет распределение клеток донорской культуры в ткани яичка, а также доза клеток и плотность заселения семенных канальцев. Причем до сих пор в литературе поддерживается дискуссия о том, как лучше вводить донорский трансплантат в канальцевую сеть яичка [122]. Наиболее эффективной считается микроинъекция донорских клеток в сеть яичка с последующим заполнением нескольких семенных канальцев. Для достижения этой цели разработаны три способа введения донорских клеток: непосредственное введение культур в семенные канальцы с помощью микропипетки, при этом введенные донорские зародышевые клетки вытесняются в сеть яичка из инъецированного канальца и затем могут поступать в другие семенные канальцы. Второй метод заключается во введении микропипетки непосредственно в сеть яичка и инъекции донорских клеток, которые заполняют сеть и поступают в семенные канальцы. Третий способ заключается в том, чтобы ввести микропипетку в один из эфферентных протоков и продеть ее в сеть яичка в ретроградном направлении, а затем ввести культуральную взвесь с помощью микрофорсунки. Этот метод является наиболее точным для контроля объема

инъекции, поскольку из места введения микропипетки может вытечь меньше клеточной суспензии, и обычно можно достичь заполнения семенных канальцев от 70 до 90% [10]. Тем не менее, несмотря на эффективность данных методик для запуска первичных репаративных реакций, способ введения культур большого значения не имеет.

В настоящее время накоплен значительный материал о различных аспектах возможного применения культур, обогащенных различными видами стволовых клеток (сингенных, аутологичных и т.д.) для разработки технологии восстановления фертильности у мужчин. Полученные результаты дают определенные надежды и перспективны для дальнейшего изучения. Эффективность трансплантации при пересадке культур, обогащенных сперматогенными стволовыми клетками, у животных в различных вариантах по разным данным, колеблется от 18 до 80% [14, 115].

В данной работе исследованы репаративные возможности клеточных культур различного происхождения, включая межвидовые варианты (ксеногенные), внутривидовые (аллогенные) и вариант пересадки клеточной культуры в рамках одного организма (аутологичный вариант). Для оценки эффективности ксеногенного варианта терапии было использовано 7 групп экспериментальных животных (беспородных крыс Wistar). При этом животным моделировался абдоминальный двухсторонний крипторхизм по Дендеберову-Кирпатовскому, затем, через 3 недели экспозиции, животным оперативным способом под белочную оболочку вводилась клеточная культура соответствующего вида и объема. В каждой группе было выделено по 4 животных, которые после пересадки находились под наблюдением для оценки фертильности, которых держали отдельно и сажали в клетки к самкам. Модель является удобной, вызывающей серьезные нарушения функции сперматогенного эпителия, угнетающей сперматогенез, а также гормонпродуцирующую функцию яичек. Индивидуальные репаративные реакции, при отсутствии стимуляции минимальны, поэтому данная модель является оптимальной для изучения клинических эффектов исследуемых клеточных культур. Повреждения тканей яичка при двухстороннем абдоминальном крипторхизме сопровождалось достоверным снижением средних значений ингибина Б во всех группах к 21 суткам наблюдения. Восстановление уровня ингибина Б до первоначального уровня, на фоне репаративных процессов, отмечалось не ранее 90 суток. С учетом того, что восстановление сперматогенеза у экспериментальных животных до зрелых форм занимает не менее 72 суток, можно отметить, что уровень ингибина Б тесно коррелирует с состоянием сперматогенного эпителия семенных канальцев, а восстановление функции сперматогенного эпителия идет более медленно, по сравнению с герминогенной функцией яичек и уровнем общего тестостерона, который восстанавливается до нормальных значений уже к 14 суткам. На фоне использования модели был выявлен кратковременный гормональный дисбаланс, характерный для

гипергонадотропного гипогонадизма, который после ликвидации крипторхизма, восстанавливается уже к 14 суткам, а функция сперматогенного эпителия восстанавливалась не ранее 72 суток, что косвенно подтверждается изменением концентрации ингибина Б, которая восстанавливается до исходных значений не ранее 90 суток наблюдения.

Крипторхическая модель приводит к значительным нарушениям сперматогенеза, так как к 21 суткам практически 100% канальцев лишены признаков сперматогенеза до конечных форм. В большинстве из них определяются клетки Сертоли и единичные элементы дифференцировки стволовых клеток. В отдельных канальцах отмечается потеря клеток Сертоли, вследствие чего канальцы спадаются и признаков начального сперматогенеза в них нет. В некоторых канальцах отмечается десквамация росткового слоя и умеренная лимфоцитарная инфильтрация. Тем не менее, такие повреждения не фатальны, так как ряд канальцев сохраняют отдельные элементы сперматогенеза и отдельные локусы с направленной дифференцировкой.

После использования культур, обогащенными стволовыми / прогениторными клетками ксеногенного происхождения, к 90 суткам было отмечено, что большинство канальцев имеет признаки сперматогенеза, причем в отдельных канальцах встречаются сперматозоиды, но в тех локусах, которые утратили клетки Сертоли, даже к 90 суткам признаков прогениторной дифференцировки не выявлено, канальцы спавшиеся, заполнены гомогенным эозинофильным содержимым, в межканальцевых локусах сохраняется лимфоцитарная инфильтрация умеренной выраженности. Популяция клеток Лейдига при этом может увеличиваться в количестве, но клетки имеют признаки функционального напряжения (меньшую «исчерченность», меньшее число хромаффинных гранул).

Было выявлено, что у всех групп животных после пересадки в ксеноварианте, восстановление сперматогенеза шло с различной интенсивностью, но примерно равными темпами. Прямых корреляций между видовым составом культуры и интенсивностью репарации, а также качественным составом сперматогенеза у животных выявлено не было. Тем не менее, во всех клинических группах, включая контроль, отмечалось снижение индекса сперматогенеза, что свидетельствует о репаративных возможностях местных тканей яичка, которые усиливаются на фоне эффектов экспериментальной терапии. Наиболее эффективным было восстановление сперматогенеза у группы животных, получавших в качестве терапии культуру клеток фетального яичка человека, причем коэффициент фертильности в этой группе был самым высоким – 4,74, а общее число беременностей в группе составило 58%. И хотя у животных после крипторхического повреждения, репродуктивный потенциал снижен не менее чем в 2,5 раза, их можно считать фертильными, так как среднее число новорожденных крысят



в группах ксеноварианта составило  $2,69 \pm 0,64$  новорожденных в одном помете, в то время, как у стандартной крысы в помете рождается не меньше 7,0 детенышей.

Следует отметить, что экспериментальная терапия культурами, обогащенными клетками ксеногенного происхождения, способствует восстановлению сперматогенеза и фертильности у крыс с нарушениями сперматогенеза на фоне использования крипторхической модели.

При этом, на фоне выраженного повреждения сперматогенного эпителия, в большинстве канальцев сохраняются признаки частичной прогениторной дифференцировки, что может служить основой для репаративных процессов после терапии обогащенными клеточными культурами, но те семенные канальцы, которые имеют частичное повреждение клеток Сертоли, даже к 90 суткам не имеют признаков сперматогенеза, несмотря на наличие свободной клеточной ниши.

У животных всех экспериментальных групп после устранения двухстороннего абдоминального крипторхизма нормализация уровней гонадотропинов происходила уже к 14 суткам, что подтвердило результаты, опубликованные нами ранее [14]. Восстановление концентраций ингибина Б к исходному уровню происходило не ранее 90-120 суток наблюдения, тем не менее, оно происходило, что может свидетельствовать о сохранении и активации сперматогенеза в уцелевших локусах семенных канальцев.

Наиболее продуктивным было восстановление сперматогенеза у группы животных, перенесших трансплантацию культуры клеток фетального яичка человека. В этой группе коэффициент фертильности был самым высоким – 4,74, а общее количество беременностей в группе составило 58%. Наихудшие результаты получены в группе животных перенесших терапию «микст» – культурой мезенхимальных клеток костного мозга. В этой группе удалось получить только 1 беременности у 12 самок, соответственно коэффициент фертильности составил 0,75. Среднее количество беременностей в группах ксеноварианта – 33,27%. Среднее число новорожденных крысят –  $2,69 \pm 0,64$  в одном помете, что гораздо ниже, чем в стандартном помете, полученном от здорового самца – не меньше 7,0, причем их репродуктивный потенциал снижен, фактически в 2,5 раза по сравнению со здоровыми животными. В группе контроля ни одной беременности получено не было.

Иммуногистохимические исследования подтверждают активную прогениторную пролиферацию, подтвержденную данными гистологической картины семенников крыс, индексами сперматогенеза и уровнем половых гормонов на ранних и поздних сроках (90-120 суток) наблюдения.

Исследование клинической эффективности терапии клеточными культурами аллогенной природы также способствовало восстановлению сперматогенеза и фертильности у крыс с нарушениями сперматогенеза на крипторхической модели. Гистологическое строение

эктомированных в контрольные сроки тестикул напоминает картину у животных, перенесших пересадку в межвидовых и во внутривидовом варианте. Активация и регенерация сперматогенеза во всех группах, кроме контроля, происходило линейно, с разной интенсивностью и скоростью, и 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, также, как и в ксеногенном варианте, выявлено не было.

В среднем в аллогенных группах частота возникновения беременностей составила 20,83%, среднее число новорожденных –  $2,9 \pm 0,58$  в одном помете. Самцов породной группы Wistar, давших потомство, можно считать фертильными по сравнению с контролем, но их репродуктивный потенциал в 2,0 раза более низкий по сравнению со здоровыми животными.

Для оценки клинического эффекта в аутологичном варианте были использованы лабораторные крысы линии Campbell, которые являются генетическими близнецами и забор тестикулярной ткани у одного животного с последующей трансплантацией клеточной культуры другому животному этой же линии, может рассматриваться как трансплантация в пределах одного организма. У крыс линии Campbell после устранения двухстороннего абдоминального крипторхизма и разрешения гипергонадотропного гипогонадизма, также происходило достаточно быстрое восстановление уровня общего тестостерона до нормальных значений уже 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. Восстановление сперматогенеза в аутологичном варианте происходило стабильно, и к 90 суткам наблюдения крысы линии Campbell имели полный цикл сперматогенеза, причем 75% всех крыс линии Campbell достигли показателя фертильности. Эти данные подтверждены исследованиями гистологии тканей, измерениями индекса сперматогенеза и показателем фертильности. Беременность была получена у 5 самок из 12 (41,6%), что также является сравнительно хорошим показателем, по сравнению с ксеногенным и аллогенным вариантом.

У животных в группе аллогенного варианта количество новорожденных крысят в одном помете составило  $3,6 \pm 0,54$ , что является самым высоким показателем среди всех экспериментальных групп (в ксеногенном –  $2,69 \pm 0,64$ , в аллогенном –  $2,9 \pm 0,58$ ). Репродуктивный потенциал, безусловно, ниже чем у здоровых животных, 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). В группе контроля, которая использовалась для сравнения всех основных групп и клинических вариантов терапии, ни одной беременности получено не было.

Интересно, что, согласно данным ряда авторов, когда сперматогониальные стволовые клетки (SSC) от взрослых мышей трансплантировали бесплодным щенкам и семенникам взрослых реципиентов, количество сперматогенных колоний, образующихся в семенниках щенков, было примерно в 10 раз больше, чем в семенниках взрослых, а длина образующихся колоний была в четыре раза больше в семенниках щенков, чем в семенниках взрослых особей. Эти результаты показывают, что ниша SSC у щенков более доступна и поддерживает трансплантированные SSC эффективнее, чем у взрослых. И наоборот, яички у взрослых особей дают менее выраженный ответ при трансплантации SSC. Хотя некоторые самцы мышей могут поддерживать сперматогенез и фертильны до старости (старше 2 лет), количество SSC начинает уменьшаться после первого года жизни и обычно очень низкое к 2 годам. Несмотря на то, что количество SSC у старых самцов невелико, длина колонии, образованной трансплантированными SSC от молодых и старых самцов, одинакова [28, 167].

В нашем наблюдении восстановление сперматогенеза у животных, перенесших трансплантацию культуры яичка новорожденной крысы Wistar, было более эффективным, причем коэффициент фертильности в этой группе был самым высоким – 2,49, а общее число беременностей – 25,0%. В то время как во «взрослой» группе животных, перенесших терапию культурой клеток яичка взрослой крысы Wistar, удалось получить только 2 беременности у 12 самок, соответственно коэффициент фертильности самцов составил 1,25, а частота возникновения беременностей составила 20,83%. При этом, среднее число новорожденных крысят составило  $2,9 \pm 0,58$ , что гораздо ниже числа в обычном помете. Тем не менее, животных, давших потомство, можно считать фертильными, но их коэффициент фертильности в 2,0 раза ниже, чем у здоровых крыс. В группе контроля беременностей не было.

В экспериментальном исследовании, которое сравнивало эффективность билатеральной и моноорганной трансплантации, культуры аллогенной природы изучались на бусульфановой токсической модели с трехнедельным интервалом для гарантированной остановки эндогенного сперматогенеза. Через 35 дней после индукции азооспермии в правый семенник хомячка интраканаликулярно вводили культуру МСК через эфферентный проток и использовали в качестве основной группы. Контралатеральное яичко без клеточной терапии служило группой контроля у животного, имеющего признаки азооспермии. Гистоморфометрический анализ семенников и придатков яичек после введения МСК показал, что эпителиальная ткань семенных канальцев обычно восстанавливалась в большинстве семенных канальцев

до конечных форм сперматозоидов. Необработанные семенные каналы и придатки яичка группы азооспермии были пустыми [166].

Следует отметить, что концентрации гонадотропинов после терапии в нашем наблюдении статистически достоверно и линейно снижались ( $p$  менее 0,05), причем в группе с билатеральной пересадкой отмечено более выраженное снижение ФСГ, по сравнению с ФСГ в группе с молатеральной пересадкой. По всей видимости, рубцовые процессы, протекающие в контрлатеральном яичке, оказывают тормозящее действие на яичко, в котором идут активные процессы репарации, что подтверждается различиями в кривых восстановления концентраций нормального уровня гонадотропинов, что объясняет менее выраженное снижение уровня ФСГ к 28 суткам наблюдения. Аналогичную статистически достоверную ( $p=0,001$ ) разницу выявили при сравнении кривых уровней Ингибина Б в группах в молатеральном и билатеральном вариантах, причем к 90 суткам разница между величиной средних показателей составила более 20 пг/мл. Согласно полученным нами данным, 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.

При исследовании индекса фертильности в дозозависимых группах было выявлено, что животные, получившие дозы 500000 ЕД и 50000 ЕД способны дать здоровое и фертильное потомство. Доза 5000 ЕД не привела к восстановлению фертильности, несмотря на адекватный уровень половых гормонов и признаки некоторого снижения индекса сперматогенеза. Поэтому, минимальной терапевтической дозой может считаться доза 50000 ЕД, но более эффективно использовать более высокие концентрации. С учетом полученных данных, более оптимальна терапевтическая доза 500000 ЕД, потому что после пересадки эти животные обладали максимальным индексом фертильности, который был в 4 раза больше, чем в группе с дозой 50000 ЕД. Соответственно, использовать дозы в диапазоне от 50000 до 500000 ЕД не целесообразно, так как на максимальной дозе 500000 ЕД восстановление репродуктивного потенциала достигало максимального значения всего лишь у 37,5% животных.

Клеточная трансплантация, согласно данным гистологических и иммуногистохимических исследований, является более перспективным вариантом для лечения нарушений сперматогенеза. Клетки Сертоли регулируют направленную дифференцировку клеток, являясь иммунотолерантными клетками, которые обеспечивают нормальную функцию гемато-тестикулярного барьера, а также выживание и защиту трансплантированных донорских клеток от иммунных или воспалительных реакций [159]. Кроме того, сами клеточные культуры, полученные из тестикулярной ткани различного происхождения, обладают

иммуносупрессивными свойствами, что делает их подходящими для аллогенной трансплантации. При этом, не следует забывать о том, что трансплантация ССК способна активировать синтез антиспермальных антител у мышей, имеющих признаки повреждения ГТБ и азооспермию [151].

Согласно полученным данным, после введения клеточных культур, на поздних сроках была зафиксирована выраженная прогениторная клеточная трансформация (Dazl), причем активность ССК у крыс остается на 90 сутки наблюдения весьма высокой и подтверждается свечением антител, окрашенных к маркерам Oct-4 и ядерному красителю Хехст 3344. Активность прогениторной дифференцировки (Stella и DDX) и сперматогенной пролиферации также сохраняется очень высокой, и подтверждается окраской антителами к N-кадгерину.

Благодаря некоторым механизмам трансплантированные донорские клеточные культуры способны запускать репаративные стимулирующие сперматогенез процессы. Они способны стимулировать синтез определенных индукторов после активации процессов преддифференцировки, или секретировать целый пул факторов роста для стимуляции инактивированных стволовых клеток, активизируя дифференцировку сперматогоний или стимулируя функции клеток Сертоли для восстановления сперматогенеза. Еще одним предполагаемым механизмом является то, что донорские клеточные культуры, слитые с эндогенными стволовыми клетками сперматогоний, восстанавливают сперматогенез [122, 151].

Интересно, что несмотря на активный научный интерес к проблеме клинического использования стволовых клеток в решении различных тяжелых проблем, стоящих перед современной медициной, трансплантация стволовых и прогениторных клеток даже в аутологичном варианте таит в себе множество опасностей. Одной из самых сложных частей процесса включения стволовых клеток в клиническую практику является контроль их потенциалов деления и дифференцировки. Иногда их способность к неконтролируемому росту делает эти клетки способными к онкогенной трансформации. Наиболее высок этот риск для клеток эмбрионного происхождения, которые способны чаще запускать неконтролируемую дифференцировку вследствие избыточной склонности к делению, или клеточных культур, полученных от взрослых доноров, которые в процессе жизни накапливают груз генетических мутаций [45].

В связи с этим, еще одним важным моментом является возможность контролировать процессы дифференциации и управления, а также управлять направленной прогениторной дифференцировкой. Стволовые клетки могут легко дифференцироваться в самые разные клетки.

По данным С.Н. Авдейкина и А.С. Брюховецкого (2011) при интратекальных трансфузиях гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток в комплексной терапии повреждений

спинного мозга встречались осложнения: 35,4% на этапе стимуляции, 27% на этапе сепарации и 75% на этапе их клинического применения. Среди этих осложнений встречались такие симптомы как миалгии, головные боли, боли в костях и спине, астения. Чаще всего такие проявления возникали на фоне цитратной интоксикации (40%) и мышечного спазма (25%). Нарушения витальных функций встречались в 6,3% случаев, гипертермия в 15%, менингизм в 5,9% [1]. По данным литературы на фоне трансплантации наиболее часто встречаются иммунологические реакции, вплоть до анафилактического шока, тканевая эмболия, токсические реакции, образование опухолей, эктопическая оссификация, фиброзирование и другие. Встречаются такие осложнения, как инфекции, нарушения мозгового кровообращения, новообразования в спинном мозге, эпилептики и даже летальные исходы [45].

Стволовые клетки способны дифференцироваться в условиях клеточной ниши и крайне уязвимы к внешним управляющим сигналам, поэтому опасны для широкого 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, 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. Эффективность препарата апробирована клиническими примерами, которые описаны в третьей части работы. Анализ и статистическая обработка полученных результатов проведены с помощью методов непараметрической статистики для малых групп и программы Statisticav.12. Полученные результаты подтверждают то, что уже при нынешнем уровне развития науки, технологии, использующие возможности регенеративной медицины, способны исправлять повреждения сперматогенеза у мужчин.

Несмотря на то, что клеточная терапия нарушений сперматогенеза в различных вариантах (ксеногенном, аллогенном и аутологичном) дает стабильный клинический эффект, подтвержденный системой маркерного иммуногистохимического, гистологического и гормонального контроля основных этапов физиологического цикла сперматогониальных стволовых клеток (ССК) (маркеры стволовости, преддифференцировки, дифференцировки, пролиферации и т.д.), этот подход связан с различными рисками, включая развитие неоплазии. В то же время для многих типов стволовых и прогениторных клеток подтверждено, что одним из важнейших механизмов реализации их терапевтических эффектов является продукция биоактивных компонентов (факторы роста, цитокины, хемокины и т.д.). МСК человека секреторируют широкий спектр факторов роста и цитокинов, включая ключевые факторы, необходимые для поддержания жизнедеятельности ССК факторы GDNF [27], VEGF, FGF-2

и другие [19]. По-видимому, наблюдаемые нами эффекты обусловлены паракринной активностью МСК. Помимо факторов роста и других растворимых молекул, МСК секретируют различные типы внеклеточных везикул, которые также могут при введении в яичко проникать в семенные каналы и интерстиций, взаимодействовать с ССК и поддерживающими клетками и передавать к ним белки, регуляторные РНК и другие биоактивные компоненты, стимулируя процессы восстановления сперматогенеза. Роль внеклеточных везикул в сперматогенезе изучена недостаточно, хотя и показано их влияние на регуляцию созревания сперматозоидов [129].

Актуальным является и поиск оптимального биосовместимого носителя для транспортировки и обеспечения постепенного высвобождения этих факторов (эффект Депо), способствующего привлечению необходимых типов клеток в ключевой орган-мишень. Для обеспечения эффекта депо-освобождения стимулятора в органе мишени в качестве одного из наиболее перспективных бионосителей такого рода был рассмотрен коллаген. Уникальные свойства коллагена позволяют ему образовывать комплексы с биологически активными веществами и пролонгировать их действия по месту применения, а также участвовать в процессах стимуляции регенерации собственных тканей организма. Он в достаточно большом количестве присутствует в органах и тканях, манифестирует слабую антигенность, демонстрирует полное отсутствие токсических и канцерогенных свойств. Кроме того, он способен проявлять стабильную устойчивость к тканевым ферментам, обеспечить регулируемую скорость лизиса стимулятора в организме [168].

Для эффективного восстановления поврежденной ткани чаще всего недостаточно увеличить продукцию только какого-либо одного из факторов роста – необходимо сочетанное влияние нескольких факторов. Кондиционированная среда, содержащая в своем составе продукты секреции МСК, выделенных из жировой ткани, сама по себе обладает значительным регенеративным потенциалом. Биологические активные вещества, находящиеся в ее составе, способны стимулировать восстановление кровоснабжения и иннервации тканей после повреждения, способствовать активации эндогенных процессов регенерации за счет дополнительного привлечения стволовых и прогениторных клеток в область повреждения, а также ускорять заживление ожоговых и механических ран, что было доказано на различных моделях *in vitro* и *in vivo* [181].

Для изучения возможностей использования комбинации кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК человека и коллагена I типа для стимуляции репарационных процессов в тканях яичка экспериментальных животных также использовалась модель двухстороннего абдоминального крипторхизма.

Использовались серии животных, которым под белочную оболочку яичек вводили 0,1 мл коллагенового геля, содержащего 50 процентную кондиционированную среду, содержащую

продукты секреции МСК жировой ткани человека (МСК ЖТ) (КС доза 1), 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, секретируемых МСК (КС доза 2), 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, коллагеновый гель, содержащий культуру МСК ЖТ (250 тыс.кл.), для сравнения выраженности биологического эффекта самих МСК ЖТ и продуктов их секреции, а также изолированную культуру МСК ЖТ без коллагеновой основы (250 тыс.кл.), чтобы определить, насколько коллагеновый матрикс влияет на биологический эффект клеточной терапии. Из осложнений наиболее часто встречалась гипоторофия яичек и после 2-недельного пребывания в брюшной полости масса яичек уменьшалась в среднем с  $1,98 \pm 0,09$  г до  $0,82 \pm 0,06$  г ( $p < 0,001$ ). При этом у животных серий 2, 3, 4 и 6 отмечались признаки сперматогенеза, причем в сериях 3 и 6 до конечных форм. В группе КС доза 1 был выявлен блок на уровне темных сперматогоний класса А и зрелых сперматид, в группе коллаген + DMEM блок сперматогенеза развивался на уровне сперматоцитов 1-го или 2-го порядка. В контрольной серии был получен арест сперматогенеза на уровне сперматогоний 1 порядка, так как более зрелые формы (сперматоциты 2 порядка, сперматозоиды) во всех случаях отсутствовали.

При контрольном обследовании через 3 месяца после низведения крипторхированных яичек во всех сериях (даже в контрольных) выявлены признаки некоторого улучшения сперматогенеза, при этом популяция светлых и темных сперматогоний А в большинстве семенных канальцев практически полностью восстановились. Интересно, что в контрольной серии при анализе встречались единичные локусы с относительно сохранным фрагментарным сперматогенезом, завершенным до сперматозоидов, но, в большинстве случаев, он был арестован на уровне сперматоцитов 1-го и 2-го порядка. В сериях животных, которым вводили гель с неконцентрированной КС и DMEM состояние сперматогенеза не отличалась от контроля. В опытах с концентрированной КС (доза 2) и МСК выявляли завершенный сперматогенез в большинстве (КС доз 2) или во всех (МСК) случаях. Серию с введением геля+МСК не анализировали в связи с выявлением у всех 100% животных этой серии гистиоцитарной гранулемы, что явилось дополнительно выявленным осложнением.

Кроме того, следует отметить, что сама среда DMEM обладает репаративными возможностями, так как через 3 месяца при контрольном обследовании было выявлено, что количество атрофичных канальцев в этой серии составило  $52,12 \pm 2,19$ , в то время как в контроле –  $75,26 \pm 6,17$  канальцев на единицу условной площади препарата. В остальных сериях количество канальцев с признаками атрофии, а также спавшихся или заполненных гомогенным



эозинофильным содержимым продолжало снижаться, составив в серии гель+КС доза 1  $0,03 \pm 0,01$ , КС доза 2 –  $0,78 \pm 0,13$  и МСК –  $6,13 \pm 0,52$  канальцев. Через 1 месяц после ликвидации крипторхизма, в сериях 2 и 3, а также в серии 5 было выявлено некоторое увеличение общего количества сперматозоидов по сравнению с контрольными сериями, тогда как в отношении подвижных клеток существенных различий обнаружено не было. Через 3 месяца отмечено значительное увеличение общего количества и количества подвижных сперматозоидов в сериях 2, 3 и 6, но наибольший прирост этих показателей был получен в серии с использованием концентрированной 100% КС. Для сравнения, у животных, перенесших пересадку культуры МСК, было отмечено повышение общего количества сперматозоидов (в среднем до 9 156 000 сперматозоидов), причем 1 656 000 относились к подвижной фракции (18,1%). Этот факт свидетельствует о серьезном клиническом эффекте, который способна оказывать культура МСК на активность репарационных процессов в яичках при повреждениях сперматогенеза.

Таким образом, введение под белочную оболочку яичек обогащенной клеточной культуры МСК ЖТ или кондиционированной среды этих клеток с концентрированными факторами роста на коллагеновом геле, успешно стимулирует процессы репарации сперматогенеза на животной крипторхической модели. При этом наиболее клинически значимый эффект был получен 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 [14]. Интересно, что при введении неконцентрированной КС МСК ЖТ, несмотря на уровневый блок, количество сперматоцитов 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, сравнимый с эффектом клеточной культуры.

Важное значение имеет осложнение, полученное нами у животных перенесших пересадку культуры МСК на коллагеновом геле. Развитие специфической гистиоцитарной гранулемы, вызывающей локальное замещение семенных канальцев в условиях серьезной сопутствующей ишемии ткани, связано с тем, что коллагеновый носитель сыграл роль своеобразной клеточной

ниши для МСК, лишив стволовые клетки жировой ткани воздействия внешних управляющих дифференцировкой сигналов [43] и, после пространственной ориентировки клеток в условиях «коллагеновой ниши», репарационный потенциал МСК был ориентирован на формирование гранулематозной ткани. Самый важный факт состоит в том, что у всех животных этой серии, в той части тестикул, в которых не было обнаружено гранулематозной ткани, через 3 месяца наблюдения было выявлено, что большинство семенных канальцев характеризовалось малым количеством клеток Сертоли, признаками атрофии и склероза, что свидетельствовало 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.

Сообщения в мировой литературе, касающиеся клинической апробации, сообщают только о единичных случаях и не могут предложить универсального варианта. Кроме того, большинство имеющихся публикаций о проведенных экспериментальных исследованиях, несмотря на огромный пул различных технических сложностей, а также ряд этических, моральных, юридических и технологических вопросов, отмечают перспективность изучения данного направления, но отсутствие универсальности выбора технологии, часто затрудняет интерпретацию имеющихся функциональных результатов и их клиническую апробацию [72, 160].

В нашем случае, клинический эффект использования клеточных культур был продемонстрирован в тяжелых случаях, когда консервативное и оперативное лечение в течение длительного времени оказались неспособными обеспечить наступление долгожданной беременности. Данный вариант клинической апробации оказался возможным на основе решения ученого совета и локального этического комитета ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства Здравоохранения РФ, г. Москва (директор, академик РАН Сухих Г.Т.) в период 2009-2010 г и период 2016-2019 г. Клинический этап обследования был проведен на базе научно-поликлинического отделения, культуральные работы на базе лаборатории клинической иммунологии. Пациентам проведен стандартный алгоритм обследования, сперматологического обследование, исследование МАР теста, фрагментаций ДНК, исключение экстрагенитальных причин infertility. Все пациенты в анамнезе имели 2-4 курса консервативной стимулирующей терапии, с нестабильным клиническим эффектом. Ввиду наличия стойких нарушений им было предложено проведение терапии обогащенными стволовыми клеточными культурами аутологичной природы. Терапия клетками аутологичной природы оказалось эффективным при рецидиве варикоцеле и астенотератозооспермии высокой

степени на фоне хламидиоза у пациента 37 лет, при иммунном факторе бесплодия и блокаде семявыносящего протока с одной стороны у пациента 28 лет, при тяжелой астенозооспермии на фоне иммунного фактора у пациента 33 лет, при криптозооспермии у пациента 56 лет, при олигоастенотератозооспермии, на фоне гипергонадотропного гипогонадизма, с выявленной микроделецией AZFc (SY 1192) у пациента 44 лет, а также при идиопатической олигоастенотератозооспермии у пациента 27 лет. Все клинические случаи закончились беременностью, но судьбу этих беременностей удалось отследить только в 2 случаях, которые закончились срочными родами в ФГБУ НМИЦ АГ и П Минздрава РФ: беременность у пары, в которой мужской фактор был обусловлен с астенозооспермией, на фоне стойкого иммунного фактора у пациента 33 лет, а также у пары с мужским фактором, обусловленным криптозооспермией. Остальные беременности наблюдались в других клинических центрах РФ и выявить исходы возникших беременностей у этих пациентов не удалось.

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, и ряд этических и юридических вопросов, так как при пересадке 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, имеющем «забарьерные» иммуносупрессивные свойства. Обогащенные культуры МСК аутологичной природы оказали решающий вклад в преодоление таких сложных клинических ситуаций, как иммунологическое бесплодие, при непроходимости семявыносящего протока с одной стороны, при идиопатической олигоастенотератозооспермии (криптозооспермии), у пациента с олигоастенотератозооспермией, при гипергонадотропном гипогонадизме и наличием микроделций AZFc (SY 1192), а также идиопатической олигоастенотератозооспермии.

Полученные результаты не противоречат большинству имеющихся в мировой печати сообщений о клиническом применении обогащенных клеточных культур в сложных клинических ситуациях. Тем не менее, большинство работ [148, 177], публикуемых в мировой печати, свидетельствуют о том, что работы по использованию клеточной терапии при бесплодии у мужчин в настоящее время находятся на стадии экспериментальных доклинических исследований. Сообщения о единичных случаях клинической апробации, несмотря на частичный успех, носят несистемный характер [149].

С нашей точки зрения, более перспективно к адаптации в клиническую практику направление исследований, касающееся использования не самих стволовых и прогениторных клеток, а их факторов роста. При этом, управляемость процессами локальной репарации функций сперматогенного эпителия более очевидна, 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 даже в условиях внешнего экранирования. Помимо ряда этических, правовых, биологических и медицинских проблем, значительно осложняющих перспективу клинического использования клеточных культур [149], терапия стволовыми клетками, при определенных условиях, может являться небезопасным способом решения проблемы мужского бесплодия. Факторы роста стволовых и прогениторных клеток подобные нюансы исключают.

В заключение следует отметить, что, несмотря на то, что проведенные эксперименты не позволяют сегодня со 100% уверенностью рекомендовать стволовые клетки для клинического применения при лечении инфертильности у мужчин, ввиду достаточно серьезных осложнений, а также ряда социальных, юридических, этических и других факторов, отдельные направления, в частности использование факторов роста МСК, являются более перспективными для успешного клинического внедрения, что является альтернативным и, в некоторых нюансах, определяющим путем для дальнейших исследований.

В нашем исследовании впервые проведена оценка эффективности полного цикла лечения инфертильности у пар с мужским бесплодием. Проанализированы неудачи и дан процентный прогноз на получение беременности в паре, где мужчины имеют то или иное заболевание, нарушающее процессы сперматогенеза и фертильность. Впервые дана комплексная оценка эффективности терапии культурами, обогащенными стволовыми и прогениторными клетками в различных тканеспецифичных вариантах и сочетаниях. 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

процессов стволовости, функциональной активности, дифференцировки и направленной пролиферации стволовых клеток до и после экспериментальной терапии клеточными культурами. 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, предложенной как альтернативный путь решения проблемы мужской инфертильности. По решению ученого совета и локального этического комитета ФГБУ НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии Минздрава РФ проведено исследование возможностей изучаемого метода в безальтернативных клинических ситуациях у 6 пациентов.

Итогом проведенной работы следует признать тот факт, что возможности современного лечения мужской инфертильности имеют невысокий уровень успеха, и даже ЭКО не способно, при некоторых формах обеспечить наступление долгожданной беременности. Использование клеточных культур, особенно аутологичной природы, дает отличный клинический эффект восстановления нарушений сперматогенеза и фертильности на животных моделях, но даже при таком варианте возможны серьезные осложнения, например, развитие гистиоцитарной гранулемы, как в нашем наблюдении. Иногда, не выявленные или недооцененные малейшие нюансы способны привести к неблагоприятному исходу, даже при самых благоприятных вариантах трансплантации, в том числе в условиях естественной иммуносупрессии и тогда исход лечения может стать непредсказуемым. Использование кондиционированных сред с факторами роста стволовых клеток является альтернативным направлением, которое позволяет избежать множества вопросов, касающихся предсказуемости клинического ответа, но более безопасных, по сравнению с трансплантацией клеточных культур. Проведенные экспериментальные испытания, касающиеся использования факторов роста у животных с индуцированным бесплодием, в рамках нескольких грантовых проектов, проводимых на базе НИИ регенеративной медицины, МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова, позволили разработать и создать комбинированный препарат «Медирег», состоящих из лиофилизата концентрированной кондиционированной среды, обогащенной факторами роста в комбинации с коллагеновым носителем для обеспечения эффекта депо. В настоящее время этап регистрации и преклинических испытаний завершен, разработан протокол и поданы документы для регистрации проведения I фазы клинических испытаний. У этого препарата, согласно данным преклинических исследований, имеются хорошие перспективы по дальнейшему изучению клинических эффектов факторов роста мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани для преодолению фактора мужской инфертильности.

## Примеры клинической апробации терапии обогащенными клеточными культурами

### *Пример 1. Рецидив варикоцеле слева. Астенотератозооспермия высокой степени*

Больной Х.О., 37 лет (ИБ № 0531/2010), обратился с жалобами на бесплодный брак в течение 8 лет. По результатам комплексного обследования поставлен диагноз: «первичное бесплодие, правостороннее варикоцеле, хламидиоз». Прошел антибиотикотерапию, затем выполнено легирование вен по Иванисевичу. Через 3 мес. после операции наступила беременность, прервавшаяся спонтанным абортom. При повторном обследовании обнаружен рецидив варикоцеле справа, в эякуляте – АСАТ. Параметры спермограммы: объем – 3,0 мл, количество сперматозоидов – 25 млн/мл, активно-подвижных форм – 28%, патологических форм – 28%, ИКС – 19,4 ед, MAR-тест-IgG – 16%. Назначено лечение Альфетином: через день В/М в первый месяц, затем 2 раза в неделю. Через месяц терапии: объем – 3,8 мл, концентрация – 41 млн/мл, активно-подвижных и морфологически неполноценных – 21 и 20% соответственно, ИКС увеличился до 48,6 ед, MAR%IgG – отрицательно (0%). Рекомендовано продолжить лечение. Через 3 мес.: объем – 3,6 мл, концентрация – 25%, активно-подвижных – 20%, патологических форм сперматозоидов – 36%, ИКС – 20,2 ед., MAR%IgG – 2%. В том же месяце после ИОСС наступила беременность.

### *Пример 2. Иммунологическое бесплодие.*

#### *Непроходимость семявыносящего протока с одной стороны*

Больной Б.А., 28 лет, (ИБ № 1053/2010) наблюдался по поводу бесплодного брака в течение 6 лет. Эякулят: нормозооспермия, MAR%IgG=100%. Ранее лечение рецидивирующего хламидиоза двумя последовательными курсами антибиотиков. Увеличен правый придаток по всей длине, при пальпации безболезнен. Диагноз: «Иммунологическое бесплодие. Односторонняя непроходимость семявыносящего тракта». От реконструктивной операции больной отказался. Специфическая терапия последовательно Вобэнзимом, Альфетином, Метилпреднизолоном по описанным выше схемам без успеха. Выполнена трансплантация фетальных клеток негенетальных органов. Эякулят до трансплантации: объем – 2,6 мл, концентрация сперматозоидов в 1 мл – 26 млн/мл, активноподвижные сперматозоиды категории А – 30%, уровень тератозооспермии – 18%, ИКС – 21,1 ед, MAR тест-IgG 100% и IgA – 25%, ПЦМ для IgG, IgA, IgM – 18% (63 ед), 26% (1 ед.), 18% (70 ед.), соответственно. Через 2 недели после ТФТ<sub>но</sub>: объем – 4,0 мл, концентрация сперматозоидов в 1 мл – 58,0 млн/мл, подвижность А – 11%, патологических форм – 19%, ИКС – 67,7 ед., MAR-IgG – 100%, и IgA – 28%, ПЦМ – 3 (1) IgG, 30 (80) IgA и 6 (1) IgM. Разрешена половая жизнь без презерватива в дни вероятного зачатия или ИОСС отмытой спермой. Через 3 мес. ИКС составлял 112,1 ед, MAR%IgG и IgA – 100 и 45% соответственно. Через 5 мес. наступила беременность. Анализ

эякулята на сроке задержки менструации 3 недели: объем – 4,8 мл, концентрация сперматозоидов – 67 млн/мл, подвижность А – 28%, патологических форм – 26%, ИКС – 80,9 ед., MAR – 80% IgG и 50% IgA, ПЦМ – 29% (70 ед.) для IgG, 18% (70 ед.) для IgA и 3% (1 ед.) для IgM.

***Пример 3. Астенозооспермия. Иммунный фактор бесплодия***

Пациент С.А.А. 33 года (ИБ № 0047/2010). Пациент обратился в консультативно – диагностическое отделение ФГБУ «НМИЦ АГ и П имени В.И. Кулакова» на прием к андрологу и репродуктологу по поводу отсутствия наступления спонтанной беременности в течение 11 лет. Находится в браке, половая жизнь регулярна, индивидуальный режим – 2-3 эпизода в неделю. В анамнезе ни у него, ни у его супруги беременностей не было. Анамнез жизни не отягощен. Основных провоцирующих факторов выявить не удалось. Дизурии нет, мочеполовые органы сформированы правильно, оволосение по мужскому типу. В спермограмме: объем 2,0 мл, в 1 мл – 90 000 000 сперматозоидов, категория А – 3%, А+Б – 39%, уровень тератозооспермии – 27%, MAR-тест-IgG – 58%, IgA – 24%, IgM – 9%, – положительный. Мазок ПЦР-10 на ИППП – отрицательный. Диагноз: «Первичное иммунное бесплодие, астенозооспермия».

Пациенту выполнена подкожная одномоментная трансплантация фетальных тканей с введением клеточного материала в обе ягодицы отдельно в суммарной дозе 50 млн. клеток. При контрольном обследовании в спермограмме через 2 недели от момента введения: Образец объемом – 2,6 мл, в 1 мл – 141 000 000 сперматозоидов, категория А – 54%, А+Б – 66%, степень тератозооспермии – 18%, MAR-тест-IgG – 5%. Заключение: нормозооспермия. После проведенного лечения жалоб на наличие побочных эффектов не выявлено. Контрольная спермограмма, проведенная через 6 месяцев после трансплантации: объем 2,8 мл, сперматозоидов 105 млн в 1 мл, категория А – 12%, А+Б – 31%, MAR-тест-IgG – 9%, IgA – 6% IgM – 11% – отрицательный. Через 3 месяца после трансплантации у супруги была зафиксирована беременность, которая закончилась срочными родами.

***Пример 4. Криптозооспермия***

Пациент Ш.Х.И., 56 лет (ИБ № 5603/2009), Пациент обратился в консультативно – диагностическое отделение ФГБУ «НМИЦ АГ и П имени В.И. Кулакова» на прием к андрологу и репродуктологу по поводу отсутствия наступления спонтанной беременности в течение 10 лет. Предварительный диагноз: олигоастенотератозооспермия. Женат, супруге 35 лет, по заключению гинеколога – здорова. Более 10 лет назад до брака беременность, наступившая от будущего мужа (?), была прервана мед. абортom. В течение последних двух лет 4 неудачные попытки ЭКО ИКСИ.

Из анамнеза: удаление кисты придатка справа 5 лет назад, операция по поводу пахово-мошоночной грыжи 8 лет назад. Аллергия (полиноз). Травмы мошонки, орхит, эпидидимит, системные заболевания отрицает. Сексуальная функция: коитус в среднем 2 раза в неделю, эрекция и продолжительность акта без особенностей. Вредные факторы: работа в северных регионах, нефтехимическое производство (непосредственный контакт с нефтепродуктами отрицает).

Ранее получал лечение различными препаратами: ХГ, мочевым ФСГ, антиэстрогенами, нутриентами в рекомендованных производителями дозах без лабораторного и клинического эффекта.

Осмотр: пенис, яички, семенной канатик – без особенностей, увеличена и уплотнена головка эпидидимиса справа. Симптом Вальсальвы отрицателен с обеих сторон.

Исследования эякулята (31.08.2009): криптозооспермия (единичные сперматозоиды в центрифугате), все неподвижные и морфологически измененные. Лейкоциты – меньше 1 млн/мл. АСАТ в сперме в незначительном количестве (непрямой MAR-IgG<10%), содержание АСАТ в крови (ИФА) в пределах референсных значений (20,0 МЕ/л). Гормоны: ЛГ – 3,2 МЕ/л, ФСГ – 4,1 МЕ/л, Т – 21 нмоль/л. Кариотип: 46 XY, данных за микроделеции AZF нет. Диагноз: N46 Мужское бесплодие, криптозооспермия, идиопатическая форма.

Проведено лечение с применением трансплантации фетальных клеток по утвержденному протоколу (25.09.2009). Через 3 мес. (21.12.2009): концентрация сперматозоидов – 5 млн/мл, прогрессивно подвижных (категория В) – 10%, морфологически нормальных – 8%. Через 6 мес (11.03.2010): концентрация – 22 млн/мл, прогрессивно подвижных – 0%, морфологически нормальных форм – 0%. Через 4 мес после клеточной терапии выполнено ЭКО ИКСИ – с первой попытки получена беременность, роды в срок доношенной девочкой (2010).

***Пример 5. Олигоастенотератозооспермия, гипергонадотропная форма, микроделеция AZFc (SY 1192)***

Пациент Б.С.М., 44 года (ИБ № 5071/09), обратился по поводу бесплодного брака в течение 6 лет; до и вне брака беременностей от него не знает. Жалоб на органы мочевыделительной системы не предъявляет. Жена, 34 года: Б1, по данным обследования гинекологом – здорова.

Из анамнеза: системные заболевания, аллергию, крипторхизм, травмы яичек, орхиты и эпидидимиты отрицает, заболеваниями передаваемыми половым путем не болел. Сексуальная жизнь без особенностей.

Осмотр: яички гипоплазированы, объем по данным УЗИ слева и справа 8 и 7 см<sup>3</sup>, соответственно; придатки яичек уменьшены; вены семенного канатика не расширены, симптом Вальсальвы отрицателен с обеих сторон.



Исследования эякулята (16.05.09): объем – 7 мл, концентрация сперматозоидов – 5 млн/мл, прогрессивно подвижных – 32%, морфологически аномальных – 88% (нестрогие критерии), лейкоциты – меньше 1 млн/мл, АСАТ отсутствуют (MAR-IgG<10%), продукция активных форм кислорода (АФК) отмытыми сперматозоидами – норма (0,13 мВ/с). Гормоны: ЛГ – 3,6 МЕ/л, ФСГ – 10,0 МЕ/л, ПРЛ – 147,0, Тестостерон – 13,9 нмоль/л. Генетическое исследование: кариотип 46 XY, обнаружена микроделеция в локусе AZFc (SY 1192). Диагноз: Бесплодие первичное. Олигоастенотератозооспермия, гипергонадотропная форма, микроделеция AZFc (SY 1192).

Выполнена терапия мезенхимальными СК в соответствии с протоколом (05.09.2006).

Эякулят через 1,5 мес. (16.10.2009): объем – 2,5 мл, концентрация – 31 млн/мл, прогрессивно подвижных – 38%, морфологически аномальных – 68% (нестрогие критерии). Выполнена искусственная инсеминация отмытыми сперматозоидами. Получена биохимическая беременность, которая замерла. Эякулят через 3 мес. (11.12.2006): объем – 2,2 мл, концентрация – 8 млн/мл, прогрессивно подвижных сперматозоидов – 29%, морфологически аномальных – 65% (нестрогие критерии). Ухудшение могло быть связано со смертью матери пациента.

Рекомендовано включение в программу ЭКО. Проведено генетическое консультирование.

***Пример 6. Диагноз: Идиопатическая олигоастенотератозооспермия, нормогонадотропная форма***

Пациент С.К.Н., 27 лет, ИБ № 9360/2016. Обратился по поводу отсутствия спонтанной беременности в браке более 1,5 лет, ранее у партнеров беременностей не было. Из анамнеза: аллергический ринит (поллиноз, реакция на шерсть животных), системные и венерические заболевания отрицает, травмы и операция в нижних отделах живота отрицает. Половая жизнь без особенностей.

Осмотр: Половые органы без особенностей, развиты согласно возрасту. По данным проведенного обследования: По данным УЗИ – субклиническое двухстороннее варикоцеле, с расширением вен при пробе Вальсальвы до 2,7 мм слева, 2,4 мм справа, ретроградный кровоток не регистрируется.

В течение 2016 и 2017 года перенес несколько курсов лечения, стимулирующего сперматогенез: омега 3 жирные кислоты, мексидол, комплекс нутриентов (Андродоз) в стандартных дозировках без существенного эффекта. В 2017-2018 годах в течение 9 месяцев перенес курс Кломифена цитрата (50 мг/сут) и Бруди Плюс (3 капс/сут), с максимальным увеличением концентрации сперматозоидов с 8 до 59 млн/мл повышением подвижности с 39% до 55%, увеличением нормальных форм с 3% до 6%. После отмены препаратов отмечено

возвращение показателей спермограммы к исходным значениям. Жена: 27 лет, здорова, от ЭКО отказалась.

В ноябре 2018 г. рекомендовано проведение терапии обогащенными клеточными культурами, на фоне применения кломифена цитрата. Сперматологическая картина (ноябрь 2018 г.) – концентрация 16 млн/мл, подвижность – A+B=29%, степень тератозооспермии 91%. Через 1,5 месяца после клеточной терапии: концентрация – 27 млн/мл, подвижность A+B=51%, степень тератозооспермии 93%, нормальных форм 7%.

В феврале 2019 г., через 3 месяца после терапии обогащенными клеточными культурами, наступила спонтанная беременность, которая по настоящее время протекала без особенностей. По всей видимости, беременность наступила за счет нормализации функции сперматогенного эпителия.

### **Обсуждение результатов клинических апробаций**

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. При этом, обогащенные культуры МСК аутологичной природы оказали решающий вклад в преодоление таких сложных клинических ситуаций, как иммунологическое бесплодие, при непроходимости семявыносящего протока с одной стороны, при идиопатической олигоастенотератозооспермии (криптозооспермии), у пациента с олигоастенотератозооспермией, при гипергонадотропная форме и наличии микроделений AZFc (SY 1192), а также идиопатической олигоастенотератозооспермии, в варианте нормогонадотропной формы.

И хотя полученные результаты не противоречат большинству имеющихся в мировой печати сообщений о клиническом применении обогащенных клеточных культур в сложных клинических ситуациях, тем не менее, большинство работ [64, 99], публикуемых в мировой печати за последние 5 лет свидетельствуют о том, что работы по использованию клеточной терапии при бесплодии у мужчин в настоящее время находятся на стадии экспериментальных доклинических исследований. Сообщения о единичных случаях клинической апробации, несмотря на частичный успех, носят несистемный характер [177].

С нашей точки зрения, более перспективно к адаптации в клиническую практику, направление исследований, касающееся использования не самих стволовых и прогениторных клеток, а их факторов роста (результаты, описанные в разделе 6.6 настоящей главы). При этом, управляемость процессами локальной репарации функций сперматогенного эпителия более очевидна, 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 даже в условиях внешнего экранирования. Помимо ряда этических, правовых, биологических и медицинских проблем, значительно осложняющих перспективу клинического использования клеточных культур при лечении мужского бесплодия [177], терапия факторами роста стволовых и прогениторных клеток подобные нюансы исключает.

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

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мужское бесплодие является весьма распространенным заболеванием, от которого страдает не менее 30 миллионов мужчин во всем мире, хотя статистические данные могут существенно различаться. Бесплодие считается одной из основных проблем здоровья, влияющей на жизнь пары в репродуктивном возрасте, и серьезно ухудшающих ее качество, причем, в большей степени именно социальные аспекты, а не физиологические, так как пациенты с нарушениями фертильности жалобы на ухудшение своего здоровья предъявляют нечасто. Поэтому раннее выявление проблемы и начало ее правильного лечения встречается чрезвычайно редко и обнаруживается только после длительных и безуспешных попыток зачатия ребенка. Согласно полученным данным в бесплодных парах, мужской фактор инфертильности встречается у 54,7% мужчин, женский у 63,6%, а в 25,8% проблемы выявляются у обоих супругов.

Заболевание является полиэтиологичным и на способность мужского организма к фертильности влияют множество, иногда вообще никак не связанных друг с другом факторов, причем наиболее мощный негативный вклад оказывают окислительный стресс, курение, наличие инфекций, передающихся половым путем, и наличие воспаления в органах мочеполовой системы.

Чем больше встречается факторов, провоцирующих бесплодие у мужчин, тем сложнее добиться благоприятного прогноза. Анализируя полученную информацию, выявлено, что у пациентов инфертильных по 1 фактору, достичь нормоспермии удалось в 94,3%, по 2 факторам всего в 29,7%, при наличии более двух факторов в 13,6%. Тем не менее, общая частота неудач статистически при наличии 1 фактора достоверно составила 15,9%, по 2 факторам 43,6%, при наличии более двух факторов – 93,6%. Наиболее высоки риски неблагоприятного исхода у мужчин, бесплодных по генетическому фактору, или имеющие воспалительные заболевания репродуктивного тракта, в том числе ИППП (хламидии, уреаплазмы), а риск неудач у них составляет более 60%. При наличии варикоцеле, иммунологических факторов и эндокринных расстройств, особенно при одновременном сочетании двух и более провоцирующих факторов, отсутствие беременностей наблюдается в 46,8-58,3% случаев. При наличии у пациентов аномалий развития и строения органов репродуктивной системы, включая крипторхизм, частота неудач составляет – 30,0-33,3%. Кроме того, лечение известного фактора мужской инфертильности на 15,0% является более успешным, по сравнению с идиопатической формой.

Интересно, что при нормозооспермии количество неудачных исходов не превышало 10,25%, при других формах существенно различается, в частности, при олигозооспермии – 54,2%, при астенозооспермии, – 50,0%, при тератозооспермии – 70,2%, а при азооспермии – 81,4%. При лечении нарушений сперматогенеза, наиболее неблагоприятный исход лечения при тератозооспермии и азооспермии, при этом общее число беременностей у этих категорий пациентов составило 27 (31,7%). Кроме того, получить беременность при олигоспермии, почти в 2 раза сложнее чем ситуация, когда имеется только фактор астенизации сперматозоидов.

Основными причинами неудач в исследуемых когортах можно признать нарушения сперматогенеза в виде азооспермии (до 81,4%), тератозооспермии (до 71,2%), при одновременном наличии более 2-х факторов, угнетающих сперматогенез (до 93,6%), а также при наличии генетических, иммунологических факторов и воспалительных повреждений органов репродуктивной системы, в том числе при наличии ИППП, где риск неудачи составляет от 66,6 до 76,1%. В остальных случаях лечение infertility было сравнительно успешным.

По данным проведенного обследования современная терапия мужского бесплодия, включая возможности вспомогательных репродуктивных технологий, оказалась эффективной всего лишь у 45,9%, а в 158 случаях (54,1%) добиться беременностей в паре не удалось. При этом консервативная стимулирующая терапия показала свою эффективность, результатом которой явилась нормоспермия в 126 случаях (43,1%), и это привело к возникновению 37 беременностей (12,6%). Проведение 2 полных циклов вспомогательных репродуктивных технологий, включающих ЭКО (ICSI), позволило добиться еще 97 беременностей (всего 45,9%), причем эффективность 1 попытки составила в среднем 21,08%, что является средним показателем для 1 попытки лечения бесплодия пар, infertilityных по мужскому фактору. Таким образом, у каждого второго пациента (54,1%) с мужским бесплодием современное высокотехнологичное и дорогостоящее лечение оказалось неэффективным. Для этих пациентов требуется поиск новых методов лечения, о которых периодически сообщается в мировой печати, и терапия обогащенными клеточными культурами, а также кондиционированными средами, содержащих секретом этих клеток, является перспективным направлением по решению этой проблемы.

Исследование эффективности трансплантации культур стволовых / прогениторных клеток различного происхождения в ксеногенных, аллогенных и аутологичном вариантах, показало высокий уровень эффективности восстановления сперматогенеза на модели двухстороннего абдоминального крипторхизма, причем уровень восстановления сперматогенеза у бесплодных животных достигал показателя фертильности и обеспечивал этим

животным появление здорового и фертильного потомства. Максимальная эффективность такого лечения составила 58,0%.

У животных в группе аллогенного варианта количество новорожденных крысят в одном помете составило  $3,6 \pm 0,54$  что является самым высоким показателем среди всех экспериментальных групп (в ксеногенном –  $2,69 \pm 0,64$ , в аллогенном –  $2,9 \pm 0,58$ ). Репродуктивный потенциал безусловно, ниже чем у здоровых животных, 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). В группе контроля, которая использовалась для сравнения всех основных групп и клинических вариантов терапии, ни одной беременности получено не было.

В нашем наблюдении восстановление сперматогенеза у животных, перенесших трансплантацию культуры яичка новорожденной крысы Wistar было более эффективным, по сравнению с культурой, полученной от взрослого животного, причем коэффициент фертильности в этой группе составил – 2,49, а общее число беременностей – 25,0%, в то время как во «взрослой» группе животных, коэффициент фертильности самцов составил 1,25, а частота возникновения беременностей – 20,83%. Поэтому культуры клеток, полученных от новорожденных животных, обладают более значимым репаративным потенциалом при лечении нарушений фертильности.

Концентрации гонадотропинов после терапии в нашем наблюдении статистически достоверно и линейно снижались ( $p$  менее 0,05), причем в группе с билатеральной пересадкой отмечено более выраженное снижение ФСГ, по сравнению с ФСГ в группе с монолатеральной пересадкой. По всей видимости, рубцовые процессы, протекающие в контрлатеральном яичке, оказывают тормозящее действие на яичко, в котором идут активные процессы репарации, что подтверждается различиями в кривых восстановления концентраций нормального уровня гонадотропинов. Кроме того, статистически достоверную ( $p=0,001$ ) разницу выявили при сравнении кривых уровней Ингибина Б в группах с монолатеральным и билатеральным вариантом, причем к 90 суткам разница между величиной средних показателей составила более 20 пг/мл. Следует отметить, 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.

При исследовании индекса фертильности в дозозависимых группах было выявлено, что минимальной терапевтической дозой может считаться доз 50000 ЕД, но более эффективно использовать более высокие концентрации. С учетом полученных данных, более оптимальна терапевтическая доза 500000 ЕД, на 1 яичко, потому что после пересадки эти животные

обладали максимальным индексом фертильности, который был в 4 раза больший, чем в группе с дозой 50000 ЕД. Соответственно, использовать дозы в диапазоне от 50000 до 500000 ЕД не целесообразно, так как на максимальной дозе 500000 ЕД восстановление репродуктивного потенциала достигало максимального значения всего лишь у 37,5% животных.

Несмотря на успешные данные, полученные в нашем исследовании и активный научный интерес к проблеме клинического использования стволовых клеток в решении различных тяжелых проблем, стоящих перед современной медициной трансплантация стволовых и прогениторных клеток, даже в аутологичном варианте таит в себе множество опасностей. Одной из самых сложных частей процесса включения стволовых клеток в клиническую практику является контроль их потенциалов деления и дифференцировки. Иногда их способность к неконтролируемому росту делает эти клетки способными к онкогенной трансформации. Наиболее высок этот риск для клеток эмбрионного происхождения, которые способны чаще запускать неконтролируемую дифференцировку вследствие избыточной склонности к делению, или клеточных культур, полученных от взрослых доноров, которые в процессе жизни накапливают груз генетических мутаций.

Кроме того, даже само введение клеточных культур, помимо различных этических, юридических, социальных и других неприятных вопросов, само по себе способно вызывать достаточно неприятные осложнения, вплоть до летальных исходов, поэтому клиническая апробация этого метода в настоящее время затруднена. Стволовые клетки способны дифференцироваться в условиях клеточной ниши и крайне уязвимы к внешним управляющим сигналам, поэтому опасны для широкого 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, дают сходный клинический результат, но при этом более стабильны и предсказуемы, а, следовательно, более безопасны. Помимо факторов роста и других растворимых молекул. Мезенхимальные стволовые клетки секретируют различные типы внеклеточных везикул, которые также могут при введении в яичко проникать в семенные каналы и интерстиций, взаимодействовать с сперматогониальными стволовыми и поддерживающими клетками и передавать к ним белки, регуляторные РНК и другие биоактивные компоненты, стимулируя процессы восстановления сперматогенеза.

Для обеспечения эффекта депо-освобождения стимулятора в органе мишени в качестве одного из наиболее перспективных бионосителей такого рода был рассмотрен коллаген. Уникальные свойства коллагена позволяют ему образовывать комплексы с биологически активными веществами и пролонгировать их действия по месту применения, а также участвовать в процессах стимуляции регенерации собственных тканей организма. Он в

достаточно большом количестве присутствует в органах и тканях, манифестирует слабую антигенность, демонстрирует полное отсутствие токсических и канцерогенных свойств. Кроме того, он способен проявлять стабильную устойчивость к тканевым ферментам, обеспечить регулируемую скорость лизиса стимулятора в организме.

Для изучения возможностей использования комбинации кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК человека и коллагена I типа для стимуляции репарационных процессов в тканях яичка экспериментальных животных также использовалась модель двухстороннего абдоминального крипторхизма. Использовались серии животных, которым под белочную оболочку яичек вводили 0,1 мл коллагенового геля, содержащего 50 процентную кондиционированную среду, содержащую продукты секреции МСК жировой ткани человека (МСК ЖТ) (КС доза 1), 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), 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, коллагеновый гель, содержащий культуру МСК ЖТ (250 тыс.кл.), для сравнения выраженности биологического эффекта самих МСК ЖТ и продуктов их секреции, а также изолированную культуру МСК ЖТ без коллагеновой основы (250 тыс.кл.), чтобы определить, насколько коллагеновый матрикс влияет на биологический эффект клеточной терапии.

Через 3 месяца отмечено значительное увеличение общего количества и количества подвижных сперматозоидов в сериях 2, 3 и 6, но наибольший прирост этих показателей был получен в серии с использованием концентрированной 100% КС (серия 3). Интересно, что у животных, перенесших пересадку культуры МСК, было отмечено повышение общего количества сперматозоидов, в среднем до 9 156 000 сперматозоидов, причем 1 656 000 относились к подвижной фракции (18,1%), что подтверждает серьезный клинический эффект, который способна оказывать культура МСК на активность репарационных процессов при повреждениях сперматогенеза. Неконцентрированная КС МСК ЖТ потенциально способна в дальнейшем выявить конечные формы сперматозоидов, по сравнению с контролем, 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, сравнимый с эффектом клеточной культуры. Итоговый уровень конечных форм сперматозоидов, при использования концентрированной культуральной среды с факторами



роста, статистически достоверно составил  $5,14 \pm 1,21$  ЕД, при использовании мезенхимальных стволовых клеток –  $6,98 \pm 1,17$  ЕД, что сравнимо по клинической эффективности.

Сообщения в мировой литературе, касающиеся клинической апробации, сообщают только о единичных случаях и не могут предложить универсального варианта. Большинство имеющихся публикаций о проведенных экспериментальных исследованиях, несмотря на огромный пул различных технических сложностей, а также ряд этических, моральных, юридических и технологических вопросов, отмечают перспективность изучения данного направления, но демонстрируют отсутствие универсальности выбора технологии, часто затрудняет интерпретацию имеющиеся функциональных результатов и их клиническую апробацию. В нашем случае, клинический эффект использования клеточных культур был продемонстрирован в тяжелых ситуациях, когда консервативное и оперативное лечение в течение длительного времени оказались не способным обеспечить наступление долгожданной беременности.

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, снимает ряд этических и юридических вопросов, так как при пересадке 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, имеющем «забарьерные» иммуносупрессивные свойства. Обогащенные культуры МСК аутологичной природы оказали решающий вклад в преодоление таких сложных клинических ситуаций, как, иммунологическое бесплодие, при непроходимости семявыносящего протока с одной стороны, при идиопатической олигоастенотератозооспермии (криптозооспермии), у пациента с олигоастенотератозооспермией, при гипергонадотропном гипогонадизме и наличием, микроделеций AZFc (SY 1192), а также идиопатической олигоастенотератозооспермии.

С нашей точки зрения, более перспективно к адаптации в клиническую практику, направление исследований, касающееся использования не самих стволовых и прогениторных клеток, а их факторов роста. При этом, управляемость процессами локальной репарации функций сперматогенного эпителия более очевидна, 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 даже в условиях внешнего экранирования,

помимо ряда этических, правовых, биологических и медицинских проблем, значительно осложняющих перспективу клинического использования клеточных культур при лечении мужского бесплодия. Терапия кондиционированных сред с факторами роста стволовых и прогениторных клеток подобные нюансы исключает.

Проведенные экспериментальные испытания, касающиеся использования факторов роста у животных с индуцированным бесплодием, в рамках нескольких грантовых проектов, проводимых на базе НИИ регенеративной медицины, МНОЦ МГУ имени М.В.Ломоносова, позволили разработать и создать комбинированный препарат «Медирег», состоящих из лиофилизата концентрированной кондиционированной среды, обогащенной факторами роста в комбинации с коллагеновым носителем для обеспечения эффекта депо. В настоящее время этап регистрации и преклинических испытаний завершен, разработан протокол и поданы документы для регистрации проведения I фазы клинических испытаний. У данного препарата, согласно данным преклинических исследований, имеются хорошие перспективы по дальнейшему изучению клинических эффектов факторов роста мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани по преодолению фактора мужской infertility.

## 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 секретомом 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.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

С учетом результатов, целесообразно продолжение работы в следующих направлениях:

1. Провести дополнительные исследования реактивности трансплантируемой ткани, клеточных культур и факторов роста, с проведением оценки их репродуктивного и репаративного потенциала с учетом иммунной привилегированности тестикулярной ткани.
2. Провести дополнительные исследования регуляторных механизмов функции сперматогониальных стволовых и прогениторных клеток в условиях клеточной ниши.
3. Провести дополнительные клинические сравнительные испытания эффективности восстановления фертильности при использовании факторов роста и клеточных культур *in vivo*.
4. Разработать единые протоколы хранения, консервации, выделения и культивирования сперматогониальных стволовых клеток, необходимые для клинической апробации терапии обогащенными клеточными культурами при нарушениях сперматогенеза.
5. Создать систему криохранилищ (криобанков) для хранения биообразцов и клеточных культур, используемых для дальнейших экспериментальных и научных работ, что также обеспечить основу для клинической апробации.
6. Разработать новые лекарственные препараты на основе секрета стволовых клеток, включающих факторы роста, цитокины, хемокины и другие компоненты, что является перспективным направлением, в том числе в области лечения мужской инфертильности.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АМГ	– антимюллеров гормон
АСАТ	– антисперматальные антитела
АТФ	– аденозинтрифосфат
БАД	– биологическая активная добавка
ВИЧ	– вирус иммунодефицита человека
ВОЗ	– Всемирная Организация Здравоохранения
ВПЧ	– вирус папилломы человека
ВРТ	– вспомогательные репродуктивные технологии
ГБО	– гипербарическая оксигенация
ГнРГ	– гонадотропин релизинг гормон
ГСПГ	– глобулин, связывающий половые гормоны
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖТ	– жировая ткань
ИБ	– история болезни
ИИСМ	– искусственная инсеминация спермой мужа
ИКСИ	– интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в цитоплазму яйцеклетки
ИППП	– инфекции, передающиеся половым путем
ИФА	– иммуноферментный анализ.
КС	– кондиционированная (концентрированная) среда
ЛГ	– лютеинизирующий гормон
МПГ	– менопаузальный гонадотропин
МСК	– мезенхимальные стволовые клетки
МСКТ	– мультиспиральная компьютерная томография
НПВС	– нестероидные противовоспалительные средства
ПРЛ	– пролактин
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РПО	– нейтрализованный препарат олигонуклеотидов
РФ	– Российская Федерация
САГ	– спермальный антиген
СК	– стволовые клетки
ТРУЗИ	– трансректальное ультразвуковое исследование

ТТГ	– тиреотропный гормон
УЗИ	– ультразвуковое исследование,
ФСГ	– фолликулостимулирующий гормон
ФГС	– федеральная служба государственной статистики
ХГЧ (ХГ)	– хорионический гонадотропин
ХПН	– хроническая почечная недостаточность
ЦМВ	– цитомегаловирус
ЭКО	– экстракорпоральное оплодотворение
ССК (SSC)	– сперматогенные (сперматогониальные) стволовые клетки
HLA	– человеческий лейкоцитарный антиген
МАР	– тест на антиглобулиновую реакцию или антиспермальные антитела
ТЕСЕ	– тестикулярная экстракция сперматозоидов



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдейкин, С.Н. Осложнения, побочные эффекты и особенности клинического применения мобилизованных аутологичных гемопоэтических стволовых клеток в комплексной терапии пациентов с повреждением спинного мозга / С.Н. Авдейкин, А.С. Брюховецкий // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. VI, № 4. – С. 104-110.
2. Активные формы кислорода и репродуктивная функция мужчин: фундаментальные и клинические аспекты (обзор литературы) / В.А. Божедомов, М.В. Торопцева, И.В. Ушакова [и др.] // Андрология и генитальная хирургия. – 2011. – № 3. – С. 1-7.
3. Брагина, Е.Е. Вирусное инфицирование сперматозоидов / Е.Е. Брагина, Е.А. Ариффулин, П.О. Хафизова // Всероссийский междисциплинарный медицинский журнал. – 2011. – № 1. – С. 20-23.
4. Быков, В.Л. Сперматогенез у мужчин в конце XX века (обзор литературы) / В.Л. Быков // Проблемы репродукции. – 2000. – № 1. – С. 6-13.
5. Виноградов, И.В. Современные методы лечения генетически обусловленного секреторного бесплодия : дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.23 / Виноградов И.В. – Москва, 2011. – 177 с.
6. Возможность получения сперматозоидов у мужчин с немозаичной формой синдрома Клайнфельтера в программах экстракорпорального оплодотворения. Обзор литературы и описание случая / И.И. Витязева, С.В. Боголюбова, Е.Е. Брагина, Е.А. Ариффулин // Андрология и генитальная хирургия. – 2014. – Т. 15, № 3. – С. 16-25. – <https://doi.org/10.17650/2070-9781-2014-3-16-25>.
7. Восстановление половой функции и фертильности экспериментальных животных под действием различных культур в алло и ксеновариантах / А.А. Камалов, Г.Т. Сухих, Е.И. Зарайский [и др.] // Естественные и технические науки. – 2010. – № 4. – С. 95-99.
8. Генетически обусловленные формы тератозооспермии / Е.Е. Брагина, Т.М. Сорокина, Е.А. Ариффулин, Л.Ф. Курило // Андрология и генитальная хирургия. – 2015. – Т. 16, № 3. – С. 28-38. – <https://doi.org/10.17650/2070-9781-2015-16-3-29-39>.
9. Денедберов, Е.С. Аллотрансплантация гипофиза в эксперименте и клинике : автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.41 / Денедберов Е.С. – Москва, 2002. – 29 с.
10. Изучение сперматогенной структуры у мышей-долгожителей samp1, склонных к ускоренному старению / А.Ю. Кулибин, С.Т. Захидов, Т.Л. Маршак [и др.] // Доклады Академии наук. – 2005. – Т. 404. – С. 971-975.

11. Ковалевский, Л.К. Разведение и содержание мелких лабораторных животных. Руководство для работников лабораторных питомников и вивариев / Л.К. Ковалевский. – 1944. – 164 с.
12. Обзор рынка биотехнологий в России и оценка перспектив его развития / Frost, Sullivan. – Московская биржа, 2014. – 69 с. – [https://media.rbcdn.ru/media/reportsRussia\\_iotechnology\\_Market\\_fin.pdf](https://media.rbcdn.ru/media/reportsRussia_iotechnology_Market_fin.pdf).
13. Образование антител к сперматозоидам вследствие хламидийного инфицирования генитального тракта как показатель нарушения фертильности мужчин / И.Н. Анискова, М.А. Гомберг, М.И. Курдина, Е.Е. Брагина // Concilium Medicum. – 2011. – Т. 1, № 4. – С. 30-36.
14. 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. Сухих, В.И. Кирпатовский [и др.] // Урология. – 2008. – № 6. – С. 7-11.
15. Получение культур стромальных клеток жировой ткани и яичка трансгенных мышей, несущих трансген GFP и их маркерный анализ / Г.Т. Сухих, Р.А. Полтавцева, Е.Ю. Плотников [и др.] // Медицинские науки. – 2010. – Т. 36, № 1. – С. 74.
16. Практическая урология : руководство для врачей / под ред. П.В. Глыбочко, Ю.Г. Аляев. – Москва: ООО «Медфорум», 2012. – 352 с. – ISBN 978-5-91891-152-5.
17. Российская Федерация. Законы : О биомедицинских клеточных продуктах : Федеральный закон № 180-ФЗ : [принят Государственной Думой 16 сентября 2003 года : одобрен Советом Федерации 08 июня 2016 года]. – Москва, 2016. – Доступ из справочно-правовой системы КонсультантПлюс.
18. Структуры хроматина сперматозоидов человека и фрагментация ДНК в норме и при нарушениях фертильности / Е.Е. Брагина, Е.А. Арифалин, П.О. Хафизова, Р.Р. Харчилава // Врач. – 2013. – № 2. – С. 81-85.
19. Терапевтический потенциал секреторных компонентов мезенхимных стромальных клеток человека: проблема стандартизации / Г.Д. Сагарадзе, О.А. Григорьева, А.Ю. Ефименко [и др.] // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61, № 6. С. 750-759. – doi: 10.18097/RVMC20156106750.
20. Федеральная служба государственной статистики : официальный сайт. – URL: [http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat\\_main/rosstat/ru/statistics/a.population/demography/#](http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/ru/statistics/a.population/demography/#).
21. Фрагментация ДНК в сперматозоидах и ее взаимосвязь с нарушением сперматогенеза / С.А. Руднева, Е.Е. Брагина, Е.А. Арифалин [и др.] // Андрология и генитальная хирургия. – 2014. – Т. 15, № 4. – С. 26-33. – <https://doi.org/10.17650/2070-9781-2014-4-26-33>.

22. A cross-sectional study of cryptorchidism in children: testicular volume and hormonal function at 18 years of age / R. Varela-Cives, R. Mendez-Gallart, E. Estevez-Martinez [et al.] // *Int. Braz. J. Urol.* – 2015. – Vol. 41, № 1. – P. 57-66. – doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2015.01.09.
23. A possible new focus for stroke treatment – migrating stem cells / R. Sullivan, K. Duncan, T. Dailey [et al.] // *Expert. Opin. Biol. Ther.* – 2015. – Vol. 15, № 7. – P. 949-958. – doi: 10.1517/14712598.2015.1043264.
24. A recurrent missense mutation in the KAL gene in patients with X-linked Kallmann's syndrome / G. Maya-Núñez, J.C. Zenteno, A. Ulloa-Aguirre [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1998. – Vol. 83. – P. 1650-1653. – doi: 10.1210/jcem.83.5.4817.
25. A Testis-Derived Hydrogel as an Efficient Feeder-Free Culture Platform to Promote Mouse Spermatogonial Stem Cell Proliferation and Differentiation / Y. Yang, Q. Lin, C. Zhou [et al.] // *Front. Cell. Dev. Biol.* – 2020. – Vol. 8. – P. 250. – doi: 10.3389/fcell.2020.00250.
26. Adetunji, P.F. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men / P.F. Adetunji, K.E. Orwig // *Stem. Cell. Res.* – 2018. – Vol. 29. – P. 207-214. – doi: 10.1016/j.scr.2018.04.009.
27. Adipose-Derived Stem Cells Stimulate Regeneration of Peripheral Nerves: BDNF Secreted by These Cells Promotes Nerve Healing and Axon Growth De Novo / T. Lopatina, N. Kalinina, M. Karagyaur [et al.] // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6, № 3. – P. e17899. – doi: 10.1371/journal.pone.0017899.
28. Aging of male germ line stem cells in mice / X. Zhang, K.T. Ebata, B. Robaire, M.C. Nagano // *Biol. Reprod.* – 2006. – Vol. 74, № 1. – P. 119-124.
29. Alechine, E. High-throughput screening for spermatogenesis candidate genes in the AZFc region of the Y chromosome by multiplex real time PCR followed by high resolution melting analysis / E. Alechine, D. Corach // *PloS one.* – 2014. – Vol. 9, № 5. – P. e97227.
30. Altered microRNA profiles of testicular biopsies from patients with nonobstructive azoospermia / H.T. Zhang, Z. Zhang, K. Hong [et al.] // *Asian J. Androl.* – 2019. – Vol. 22. – P. 100-105. – doi: 10.4103/aja.aja\_35\_19.
31. Amory, J.K. Drug effects on spermatogenesis / J.K. Amory // *Drugs Today (Barcelona, Spain).* – 2007. – Vol. 43, № 10. – P. 717-724.
32. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria / R.J. Aitken, G.N. De Iuliis, J.M. Finnie [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2010. – Vol. 25. – P. 2415-2426. – doi: 10.1093/humrep/deq214.
33. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with severe teratozoospermia / M. Mehdi, A. Gmidène, S. Brahem [et al.] // *Andrologia.* – 2012. – Vol. 44, Suppl. 1. – P. 139-143. – doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01152.x.

34. Anti-Müllerian Hormone Is a Marker for Chemotherapy-Induced Testicular Toxicity / M. Levi, N. Hasky, S.M. Stemmer [et al.] // *Endocrinology*. – 2015. – Vol. 156, № 10. – P. 3818-3827. – doi: 10.1210/en.2015-1310.
35. Antioxidants for male subfertility / R.M. Smits, R. Mackenzie-Proctor, A. Yazdani [et al.] // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2019. – Vol. 3. – P. CD007411. – doi: 10.1002/14651858.CD007411.pub4.
36. Antohi, E. Pharmacological agents that affect sperm motility / E. Antohi, C. Gales, M. Nechifor // *Revista Medico-Chirurgicala Soc. Med. Natural. din Iasi*. – 2011. – Vol. 115, № 4. – P. 1183-1188.
37. Assessment of antisperm antibodies in a sample of Egyptian patients with hepatitis C virus infection / T.M. Hussein, D. Elneily, A.A. Eid, H. Abou-EIKhier // *Andrologia*. – 2017. – Vol. 49, № 5. – doi: 10.1111/and.12664.
38. Assessment of anti-sperm antibodies in couples after testicular sperm extraction / U. Ozturk, E. Ozdemir, O. Dede [et al.] // *Clin. Invest. Med.* – 2011. – Vol. 34, № 3. – P. E179-183. – doi: 10.25011/cim.v34i3.15191.
39. Assisted reproductive technology in Europe, 2013: results generated from European registers by ESHRE / C. Calhaz-Jorge, C. De Geyter, M.S. Kupka [et al.] // *Hum. Reprod.* (Oxford, England). – 2017. – Vol. 32, № 10. – P. 1957-1973. doi: 10.1093/humrep/dex264.
40. Autologous spermatogonial stem cell transplantation in man: Current obstacles for a future clinical application / M. Geens, E. Goossens, G. De Block [et al.] // *Hum. Reprod. Update*. – 2008. – Vol. 14. – P. 121-130. – doi: 10.1093/humupd/dmm047.
41. Babanov, C.A. Effect of local and general vibration on male reproductive health / C.A. Babanov, O.V. Kosareva, E.V. Vorob'eva // *Gigiena Sanitariia*. – 2012. – № 1. – P. 27-29.
42. Baker, K. Obstructive azoospermia: reconstructive techniques and results / K. Baker, E.J. Sabanegh // *Clinics* (Sao Paulo, Brazil). – 2013. – Vol. 68, Suppl 1. – P. 61-73.
43. Bornes, T.D. Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: a comprehensive review / T.D. Bornes, A.B. Adesida, N.M. Jomha // *Arthritis Res. Ther.* – 2014. – Vol. 16. – P. 432. – doi: 10.1186/s13075-014-0432-1.
44. Bricaire, F. Zika virus: a new epidemic? / F. Bricaire // *Presse medicale* (Paris, France). – 2016. – Vol. 45, № 3. – P. 281-283.
45. Brinster, R. Spermatogenesis following male germ cell transplantation / R. Brinster, J. Zimmermann // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1994. – Vol. 91. – P. 11298-11302.
46. Cellular Therapy via Spermatogonial Stem Cells for Treating Impaired Spermatogenesis, Non-Obstructive Azoospermia / E.N. Abdelaal, B.M. Tanga, M. Abdelgawad [et al.] // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, № 7. – P. 1779. – doi: 10.3390/cells10071779.

47. CFTR Regulation of Aquaporin-Mediated Water Transport: A Target in Male Fertility / M.G. Alves, R. Sá, T.T. Jesus [et al.] // *Curr. Drug Targets.* – 2015. – Vol. 16, № 9. – P. 993-1006. – doi: 10.2174/1573399811666150615144108.
48. Chan, P.T. The evolution and refinement of vasoepididymostomy techniques / P.T. Chan // *Asian J. Androl.* – 2013. – Vol. 15, № 1. – P. 49-55.
49. Chlamydia muridarum infection-induced destruction of male germ cells and sertoli cells is partially prevented by Chlamydia major outer membrane protein-specific immune CD4 cells / A.P. Sobinoff, S.J. Dando, K.A. Redgrove [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2015. – Vol. 92, № 1. – P. 27. – doi: 10.1095/biolreprod.114.124180.
50. Chu, K. Development of inexpensive blood imaging systems: where are we now? / K. Chu, Z.J. Smith, S. Wachsmann-Hogiu // *Exp. Rev. Med. Devices.* – 2015. – Vol. 12, № 5. – P. 613-627.
51. Claustres, M. Molecular pathology of the CFTR locus in male infertility / M. Claustres // *Reprod. Biomed. Online.* – 2005. – Vol. 10. – P. 14-41.
52. Clinical and genetic analysis for a patient with 45, X/46, X, Yqh- and mixed gonadal dysgenesis] / S. Wang, H. Li, M. Su [et al.] // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* – 2016. – Vol. 33, № 2. – P. 216-220. – doi: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2016.02.020.
53. Clinical research of needle-pricking therapy for functional retrograde ejaculation / D. Cheng, L. Hu, F. Xian [et al.] // *Zhongguo Zhen Jiu.* – 2016. – Vol. 36, № 2. – P. 153-156.
54. Comparison of chromosomal abnormality rates in ICSI for non-male factor and spontaneous conception / B. Bingol, F. Abike, A. Gedikbasi [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2012. – Vol. 29. – P. 25-30. – doi: 10.1007/s10815-011-9646-1.
55. Comparison of different autogenous graft materials for reconstruction of large segment vas deferens defect: experimental study in rat / S. Nasir, S. Soyupek, S. Altuntas [et al.] // *Urology J.* – 2014. – Vol. 11, № 2. – P. 1457-1464.
56. Comparison of the effect of a combination of eight micronutrients versus a standard mono preparation on sperm parameters / M. Lipovac, F. Bodner, M. Imhof, P. Chedraui // *Reprod Biol. Endocrinol.* – 2016. – Vol. 4. – P. 84. – doi: 10.1186/s12958-016-0219-0.
57. Computer assisted image analysis to assess colonization of recipient seminiferous tubules by spermatogonial stem cells from transgenic donor mice / I. Dobrinski, T. Ogawa, M.R. Avarbock, R.L. Brinster // *Mol. Reprod. Dev.* – 1999. – Vol. 53. – P. 142-148.
58. Congenital combined pituitary hormone deficiency patients have better responses to gonadotrophin-induced spermatogenesis than idiopathic hypogonadotropic hypogonadism patients / J. Mao, H. Xu, X. Wang [et al.] // *Human Reprod. (Oxford, England).* – 2015. – Vol. 30, № 9. – P. 2031-2037. – doi: 10.1093/humrep/dev158.

59. Congenital hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome as models for studying hormonal regulation of human testicular endocrine functions / S. Trabado, S. Lamothe, L. Maione [et al.] // *Ann. Endocrinol.* – 2014. – Vol. 75, № 2. – P. 79-87. – doi: 10.1016/j.ando.2014.04.011.
60. Copy number variation and microdeletions of the Y chromosome linked genes and loci across different categories of Indian infertile males / A. Kumari, S.K. Yadav, M.M. Misro [et al.] // *Sci. Reports.* – 2015. – Vol. 5. – P. 17780. – doi: 10.1038/srep17780.
61. Correction of blood circulation in the prostate in patients with chronic prostatitis associated with urogenital infections / J.S. Kondrat'eva, A.I. Nejmark, J.D. Zheltikova, E.A. Subbotin // *Urologiia (Moscow, Russia).* – 2015. – № 2. – P. 68-70, 72-73.
62. Could androgen receptor gene CAG tract polymorphism affect spermatogenesis in men with idiopathic infertility? / V.A. Giagulli, M.D. Carbone, G. De Pergola [et al.] // *J. Assisted Reprod. Genetics.* – 2014. – Vol. 31, № 6. – P. 689-697. – doi: 10.1007/s10815-014-0221-4.
63. Cryptorchidism and Fertility / F. Fawzy, A. Hussein, M. Mahmoud Eid [et al.] // *Clin. Med. Insights. Reprod. Health.* – 2015. – Vol. 9. – P. 39-43. – doi: 10.4137/CMRH.S25056.
64. Current approaches for the treatment of male infertility with stem cell therapy / Z. Pourmoghadam, L. Aghebati-Maleki, M. Motalebnezhad [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 2018. – Vol. 233. – P. 6455-6469. – doi: 10.1002/jcp.26577.
65. De Rooij, D.G. The spermatogonial stem cell niche / D.G. De Rooij // *Microsc. Res. Tech.* – 2009. – Vol. 72. – P. 580-585.
66. Decline in seminal quality in Indian men over the last 37 years / P. Mishra, M.P.S. Negi, M. Srivastava [et al.] // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2018. – Vol. 16. – P. 103. – doi: 10.1186/s12958-018-0425-z.
67. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion / Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine // *Fertil. Steril.* – 2013. – Vol. 99, № 1. – P. 63. – doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.11.025.
68. Do cigarette and alcohol affect semen analysis? / M.Z. Keskin, S. Budak, S. Gubari [et al.] // *Arch. Ital. Urol. Androl.* – 2016. – Vol. 88, № 1. – P. 56-59. – doi: 10.4081/aiua.2016.1.56.
69. Dobrinski, I. Germ cell transplantation in pigs-advances and applications / I. Dobrinski // *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* – 2006. – Vol. 62. – P. 331-339.
70. EAU, Guidelines. – 2010. – URL: [www.http://uroweb.org/guidelines/](http://uroweb.org/guidelines/).
71. EAU, Guidelines. – 2021. – URL: [www.http://uroweb.org/guidelines/](http://uroweb.org/guidelines/).

72. Effect of External Irradiation and Immobilization Stress on the Reproductive System of Male Rats / G.G. Vereschako, N.V. Tshueshova, G.A. Gorokh [et al.] // *Radiats. Biol. Radioecol.* – 2016. – Vol. 56, № 1. – P. 56-63.
73. Effect of metabolic and antioxidant supplementation on sperm parameters in oligo-asthenoteratozoospermia, with and without varicocele: a double-blind placebo-controlled study / G.M. Busetto, A. Agarwal, A. Virmani [et al.] // *Andrologia.* – 2018. – Vol. 50. – P.e12927. – doi: 10.1111/and.12927.
74. Effect of oxidative stress on male reproduction / A. Agarwal, G. Virk, C. Ong, S.S. du Plessis // *World J. Mens Health.* – 2014. – Vol. 32. – P. 1-17. – doi: 10.5534/wjmh.2014.32.1.1.
75. Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men / E.A. Taha, A.M. Ez-Aldin, S.K. Sayed [et al.] // *Urology.* – 2012. – Vol. 80. – P. 822-825. – doi: 10.1016/j.urology.2012.07.002.
76. Effect of the male factor on the clinical outcome of intracytoplasmic sperm injection combined with preimplantation aneuploidy testing: observational longitudinal cohort study of 1,219 consecutive cycles / R. Mazzilli, D. Cimadomo, A. Vaiarelli [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2017. – Vol. 108. – P. 961-972. – doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.08.033.
77. Effect of the Oral Intake of Astaxanthin on Semen Parameters in Patients with Oligo-asthenoteratozoospermia: A Randomized Double-blind Placebo-controlled Trial / S.I. Kumalic, I.V. Klun, E.V. Bokal, B. Pinter // *(Econ) Radiol. Oncol.* – 2021. – Vol. 55, № 1. – P. 97-105. – doi: 10.2478/raon-2020-0062.
78. Effectiveness of semen washing to prevent human immunodeficiency virus (HIV) transmission and assist pregnancy in HIV-discordant couples: a systematic review and meta-analysis / M. Zafer, H. Horvath, O. Mmeje [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2016. – Vol. 105, № 3. – P. 645-655.e2. – doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.11.028.
79. Effects of co-trimoxazole, erythromycin, amoxycillin, tetracycline and chloroquine on sperm function in vitro / C.A. Hargreaves, S. Rogers, F. Hills [et al.] // *Hum. Reprod. (Oxford, England).* – 1998. – Vol. 13, № 7. – P. 1878-1886. – doi: 10.1093/humrep/13.7.1878.
80. Effects of the reduced form of coenzyme Q10 (ubiquinol) on semen parameters in men with idiopathic infertility: a double-blind, placebo controlled, randomized study / M.R. Safarinejad, S. Safarinejad, N. Shafiei, S. Safarinejad // *J. Urol.* – 2012. – Vol. 188. – P. 526-531. – doi: 10.1016/j.juro.2012.03.131.
81. Eisenberg, M.L. Invited Commentary: The Association Between Marijuana Use and Male Reproductive Health / M.L. Eisenberg // *Am. J. Epidemiology.* – 2015. – Vol. 182, № 6. – P. 482-484.

82. Epidemiology of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in the semen of male outpatients with reproductive disorders / X. Zhu, M. Li, H. Cao [et al.] // *Exp. Ther. Med.* – 2016. – Vol. 12, № 2. – P. 1165-1170. – doi: 10.3892/etm.2016.3409.
83. Esakky, P. Paternal smoking and germ cell death: A mechanistic link to the effects of cigarette smoke on spermatogenesis and possible long-term sequelae in offspring / P. Esakky, K.H. Moley // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2016. – Vol. 435. – P. 85-93.
84. Esteves, S.C. Clinical management of infertile men with azoospermia / S.C. Esteves // *Asian J. Andrology.* – 2015. – Vol. 17, № 3. – P. 459-470.
85. Evaluating the role of the serotonergic system in the control of human seminal vesicle smooth muscle-an in vitro approach / P. Birowo, S. Uckert, G.T. Kedia [et al.] // *J. Sex. Med.* – 2009. – Vol. 6, № 10. – P. 2672-2679. – doi: 10.1111/j.1743-6109.2009.01423.x.
86. Expression profile of spermatogenesis associated genes in male germ cells during postnatal development in mice / J.S. Ahn, H.-S. Ryu, S.-E. Jung [et al.] // *J. Anim. Reprod. Biotechnol.* – 2020. – Vol. 35. – P. 289-296. – doi: 10.12750/JARB.35.4.289.
87. Forbes, C.M. Spermatogonial stem cell transplantation and male infertility: Current status and future directions / C.M. Forbes, R. Flannigan, P.N. Schlegel // *Arab. J. Urol.* – 2018. – Vol. 16. – P. 171-180. – doi: 10.1016/j.aju.2017.11.015.
88. Former Abusers of Anabolic Androgenic Steroids Exhibit Decreased Testosterone Levels and Hypogonadal Symptoms Years after Cessation: A Case-Control Study / J.J. Rasmussen, C. Selmer, P.B. Østergren [et al.] // *PloS one.* – 2016. – Vol. 11, № 8. – P. e0161208. – doi: 10.1371/journal.pone.0161208.
89. Fujisawa, M. Autoimmune male sterility / M. Fujisawa // *Nihon rinsho. Japanese J. Clin. Med.* – 2006. – Suppl. 2. – P. 260-264.
90. Gangrade, B.K. Cryopreservation of testicular and epididymal sperm: techniques and clinical outcomes of assisted conception / B.K. Gangrade // *Clinics (Sao Paulo).* – 2013. – Vol. 68, Suppl. 1. – P. 131-140.
91. Genetic aspects of idiopathic asthenozoospermia as a cause of male infertility / Z. Heidary, K. Saliminejad, M. Zaki-Dizaji [et al.] // *Hum. Fertil (Camb).* – 2018. – Vol. 23, № 2. – P. 83-92. – doi: 10.1080/14647273.2018.1504325.
92. Genetic Association Between Androgen Receptor Gene CAG Repeat Length Polymorphism and Male Infertility: A Meta-Analysis / B. Pan, R. Li, Y. Chen [et al.] // *Medicine.* – 2016. – Vol. 95, № 10. – P. e2878. – doi: 10.1097/MD.0000000000002878.
93. Genetic polymorphisms of CYP2D6\*10 and the effectiveness of combined tamoxifen citrate and testosterone undecanoate treatment in infertile men with idiopathic oligozoospermia / K. Tang,



- Y.L. Zhao, S.S. Ding [et al.] // *J. Zhejiang University. Sci.* – 2015. – Vol. 16, № 3. – P. 191-197. – doi: 10.1631/jzus.B1400282.
94. Ghanem, H. Combination clomiphene citrate and antioxidant therapy for idiopathic male infertility: a randomized controlled trial / H. Ghanem, O. Shaeer, A. El-Segini // *Fertil. Steril.* – 2010. – Vol. 93. – P. 2232. – doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.01.117.
95. Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990-2017: Results from a global burden of disease study, 2017 / H. Sun, T.T. Gong, Y.T. Jiang [et al.] // *Aging.* – 2019. – Vol. 11. – P. 10952-10991. – doi: 10.18632/aging.102497.
96. Gosalvez, J. Free radical and superoxide reactivity detection in semen quality assessment: past, present, and future / J. Gosalvez, E. Tvrda, A. Agarwal // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2017. – Vol. 34. – P. 697. – doi: 10.1007/s10815-017-0912-8.
97. Hamada, A. Unexplained male infertility: potential causes and management / A. Hamada, S.C. Esteves, A. Agarwal // *Hum. Androl.* – 2011. – Vol. 1, № 1. – P. 2-16. – doi: 10.1097/01.XHA.0000397686.82729.09.
98. Hargreave, T.B. Genetic basis of male fertility / T.B. Hargreave // *Br. Med. Bull.* – 2000. – Vol. 56, № 3. – P. 650-671.
99. Histomorphometric evaluation of treatment of rat azoospermic seminiferous tubules by allotransplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells / F. Rahmanifar, A. Tamadon, D. Mehrabani [et al.] // *Iran. J. Basic Med. Sci.* – 2016. – Vol. 19, № 6. – P. 653-661.
100. Hopps, C.V. The diagnosis and treatment of the azoospermic patient in the age of intracytoplasmic sperm injection / C.V. Hopps, M. Goldstein, P.N. Schlegel // *Urol. Clin North Am.* – 2002. – Vol. 29. – P. 895-911. – doi: 10.1016/s0094-0143(02)00083-6.
101. How does employment quality relate to health and job satisfaction in Europe? A typological approach / K. Van Aerden, V. Puig-Barrachina, K. Bosmans, C. Vanroelen // *Soc. Sci. Med.* – 2016. – Vol. 158. – P. 132-140. – doi: 10.1016/j.socscimed.2016.04.017.
102. How successful is repeat testicular sperm extraction in patients with azoospermia / V. Vermaeve, V. Vermaeve, L. Van Landuyt [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2006. – Vol. 21, № 6. – P. 1551-1554. – doi: 10.1093/humrep/deh490.
103. Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY / A. Ferlin, E. Moro, A. Garolla, C. Foresta [et al.] // *Hum. Reprod. (Oxford, England).* – 1999. – Vol. 14, № 7. – P. 1710-1716. – doi: 10.1093/humrep/14.7.1710.

104. Ibtisham, F. Spermatogonial Stem Cells for In Vitro Spermatogenesis and In Vivo Restoration of Fertility / F. Ibtisham, A. Honaramooz // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, № 3. – P. 745. – doi: 10.3390/cells9030745.
105. Identification of a group of brominated flame retardants as novel androgen receptor antagonists and potential neuronal and endocrine disrupters / J.B. Kharlyngdoh, A. Pradhan, S. Asnake [et al.] // *Environ. Int.* – 2015. – Vol. 74. – P. 60-70. – doi: 10.1016/j.envint.2014.09.002.
106. Impact of CAG repeat length in the androgen receptor gene on male infertility – a meta-analysis / F. Xiao, A. Lan, Z. Lin [et al.] // *Reprod. Biomed. Online*. – 2016. – Vol. 33, № 1. – P. 39-49. – doi: 10.1016/j.rbmo.2016.03.012.
107. Impact of luteal phase support with vaginal progesterone on the clinical pregnancy rate in intrauterine insemination cycles stimulated with gonadotropins: a randomized multicenter study / K. Peeraer, T. D'Hooghe, P. Laurent [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2016. – Vol. 106, № 6. – P. 1490-1495. – doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.1096.
108. In vitro adenine nucleotide catabolism in African catfish spermatozoa / M.S. Zietara, E. Słomińska, E. Rurangwa [et al.] // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2004. – Vol. 138, № 4. – P. 385-389. – doi: 10.1016/j.cbpc.2004.04.019.
109. Incidence of antibodies in women after failure of assisted reproduction / L. Bobak, D. Bobakova, Z. Vaczy [et al.] // *Bratisl. Lek. Listy*. – 2014. – Vol. 115, № 3. – P. 145-149. – doi: 10.4149/bll\_2014\_031.
110. Infertility and reproductive disorders: impact of hormonal and inflammatory mechanisms on pregnancy outcome / S. Vannuccini, V.L. Clifton, I.S. Fraser [et al.] // *Hum. Reprod. Update*. – 2016. – Vol. 22, № 1. – P. 104-115. – doi: 10.1093/humupd/dmv044.
111. Inhibin A and B levels in serum and follicular fluids of women with various reproductive failures undergoing in vitro fertilization / K. Babčová, Z. Ulčová-Gallová, D. Rumpík [et al.] // *Ginekologia polska*. – 2015. – Vol. 86, № 10. – P. 726-730. – doi: 10.17772/gp/57844.
112. Isoform-Level Gene Expression Profiles of Human Y Chromosome Azoospermia Factor Genes and Their X Chromosome Paralogs in the Testicular Tissue of Non-Obstructive Azoospermia Patients / D. Ahmadi Rastegar, M. Sharifi Tabar, M. Alikhani [et al.] // *J. Proteome Res.* – 2015. – Vol. 14, № 9. – P. 3595-3605. – doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00520.
113. Japan's Population Shrinks for Third Year as Aging Increases / I. Reynolds. – 2014. – URL: <http://www.bloomberg.com/news/articles/2014-04-15/japan-s-population-shrinks-for-third-year-as-ranks-of-aged-grow>.
114. Jurewicz, M. Imaging and angiography in male factor infertility / M. Jurewicz, B.R. Gilbert // *Fertility and sterility*. – 2016. – Vol. 105, № 6. – P. 1432-1442.

115. Kanatsu-Shinohara, M. Fertility of Male Germline Stem Cells Following Spermatogonial Transplantation in Infertile Mouse Models / M. Kanatsu-Shinohara, H. Morimoto, T. Shinohara // *Biol. Reproduction*. – 2016. – Vol. 94, № 5. – P. 112.
116. Kanatsu-Shinohara, M. Nonrandom Germline Transmission of Mouse Spermatogonial Stem Cells / M. Kanatsu-Shinohara, H. Naoki, T. Shinohara // *Developmental cell*. – 2016. – Vol. 38, № 3. – P. 248-261.
117. Ketamine inhibits human sperm function by Ca(2+)-related mechanism / Y. He, Q. Zou, B. Li [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Communications*. – 2016. – Vol. 478, № 1. – P. 501-506. – doi: 10.1016/j.bbrc.2016.04.144.
118. Kim, E.D. Editorial Comment on «A Randomized Prospective Double-Blind Comparison Trial of Clomiphene Citrate and Anastrozole in Raising Testosterone in Hypogonadal Infertile Men» – New Comparative Insight on Alternative Therapies for Low Testosterone in Subfertile / E.D. Kim // *J. Sex. Med.* – 2015. – Vol. 12, № 8. – P. 1770-1771.
119. Kim, E.D. Oral enclomiphene citrate raises testosterone and preserves sperm counts in obese hypogonadal men, unlike topical testosterone: restoration instead of replacement / E.D. Kim, A. McCullough, J. Kaminetsky // *BJU international*. – 2016. – Vol. 11, № 4. – P. 677-685.
120. Kovac, J.R. Reproductive endocrinology: Oral enclomiphene citrate in obese men with hypogonadism / J.R. Kovac // *Nature reviews. Urology*. – 2016. – Vol. 13, № 3. – P. 133-134.
121. Kretser, D.M. The potential of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to transmit genetic defects causing male infertility / D.M. Kretser // *Reprod. Fertil Dev.* – 1995. – Vol. 7. – P. 137-142.
122. Kubota, H. Spermatogonial stem cells / H. Kubota, R.L. Brinster // *Biol. Reprod.* – 2018. – Vol. 99, № 1. – P. 52-74. – doi: 10.1093/biolre/ioy077.
123. Kumalic, S.I. Review of clinical trials on effects of oral antioxidants on basic semen and other parameters in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia / S.I. Kumalic, B. Pinter // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 426951. – doi: 10.1155/2014/426951.
124. Lawson, G. Delayed fatherhood / G. Lawson, R. Fletcher // *J. Fam. Plann Reprod. Health Care*. – 2014. – Vol. 40. – P. 283-288. – doi: 10.1136/jfprhc-2013-100866.
125. Liu, P.Y. The present and future state of hormonal treatment for male infertility / P.Y. Liu, D.J. Handelsman // *Hum. Reprod. Update*. – 2003. – Vol. 9. – P. 9-23. – doi: 10.1093/humupd/dmg002.
126. Liu, Z. Application of aromatase inhibitors in male Hypogonadism / Z. Liu, X. Wu // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. – 2015. – Vol. 95, № 48. – P. 3884-3886.

127. Loss of Gata4 in Sertoli cells impairs the spermatogonial stem cell niche and causes germ cell exhaustion by attenuating chemokine signaling / S.-R. Chen, J.X. Tang, J.M. Cheng [et al.] // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6, № 35. – P. 37012-37027. – doi: 10.18632/oncotarget.6115.
128. Lutein modulates transcription dysregulation of adhesion molecules and spermatogenesis transcription factors induced by testicular ischemia reperfusion injury: it could be SAFE / M. Al-Maghrebi, W.M. Renno, H.F. Al-Somali [et al.] // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 389, № 5. – P. 539-551. – doi: 10.1007/s00210-016-1223-9.
129. Machtinger, R. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation / R. Machtinger, L.C. Laurent, A.A. Baccarelli // *Hum. Reprod. Update*. – 2016. – Vol. 22, № 2. – P. 182-193. doi: 10.1093/humupd/dmv055.
130. Male acquired hypogonadotropic hypogonadism: diagnosis and treatment / S. Salenave, S. Trabado, L. Maione [et al.] // *Ann. Endocrinol.* – 2012. – Vol. 73, № 2. – P. 141-146. – doi: 10.1016/j.ando.2012.03.040.
131. Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility / A. Agarwal, N. Parekh, M.K. Panner Selvam [et al.] // *World J. Mens Health*. – 2019. – Vol. 37, № 3. – P. 296-312. – doi: 10.5534/wjmh.190055.
132. Male psychological adaptation to unsuccessful medically assisted reproduction treatments: a systematic review / M.V. Martins, M. Basto-Pereira, J. Pedro [et al.] // *Hum. Reprod. Update*. – 2016. – Vol. 22, № 4. – P. 466-478. – doi: 10.1093/humupd/dmw009.
133. McSweeney, L. Successful sex pre-selection using natural family planning / L. McSweeney // *African J. Reprod. Health*. – 2011. – Vol. 15, № 1. – P. 79-84.
134. MicroRNAs association with azoospermia, oligospermia, asthenozoospermia, and teratozoospermia: a systematic review / Y. Daneshmandpour, Z. Bahmanpour, S. Kazeminasab [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2020. – Vol. 37, № 4. – P. 763-775. – doi: 10.1080/21678421.2022.2100263.
135. Microsurgical TESE versus conventional TESE for ICSI in non-obstructive azoospermia: a randomized controlled study / G.M. Colpi, E.M. Colpi, G. Piediferro [et al.] // *Reprod. Biomed. Online*. – 2009. – Vol. 18, № 3. – P. 315-319. – doi: 10.1016/s1472-6483(10)60087-9.
136. Mitochondrial outer membrane permeabilization increases reactive oxygen species production and decreases mean sperm velocity but is not associated with DNA fragmentation in human sperm / F. Treulen, P. Uribe, R. Boguen, J.V. Villegas // *Mol. Hum. Reprod.* – 2016. – Vol. 22, № 2. – P. 83-92. – doi: 10.1093/molehr/gav067.
137. Molecular detection of Chlamydia trachomatis and other sexually transmitted bacteria in semen of male partners of infertile couples in Tunisia: the effect on semen parameters and spermatozoa

- apoptosis markers / H. Sellami, A. Znazen, A. Sellami [et al.] // *PloS one*. – 2014. – Vol. 9, № 7. – P. e98903. – doi: 10.1371/journal.pone.0098903.
138. Multiplex PCR based screening for micro/partial deletions in the AZF region of Y-chromosome in severe oligozoospermic and azoospermic infertile men in Iran / M. Motovali-Bashi, Z. Rezaei, F. Dehghanian, H. Rezaei // *Iranian J. Reprod. Med.* – 2015. – Vol. 13, № 9. – P. 563-570.
139. Nagano, M. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes / M. Nagano, J.R. McCarrey, R.L. Brinster // *Biol. Reprod.* – 2001. – Vol. 64, № 5. – P.1409-1416.
140. Nargund, V.H. Effects of psychological stress on male fertility / V.H. Nargund // *Nature Rev. Urol.* – 2015. – Vol. 12, № 7. – P. 373-382.
141. Nieschlag, E. *Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction* / E. Nieschlag, H. Behre. – 3d ed. – Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. – P. 35-36.
142. O'Hara, L. Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility / L. O'Hara, L.B. Smith // *Best Pract. Res.* – 2015. – Vol. 29, № 4. – P. 595-605.
143. Okada, K. Recovery of Spermatogenesis Following Cancer Treatment with Cytotoxic Chemotherapy and Radiotherapy / K. Okada, M. Fujisawa // *World J. Mens Health.* – 2019. – Vol. 37. – P. 166-174. – doi: 10.5534/wjmh.180043.
144. Paediatric and adult-onset male hypogonadism / A. Salonia, G. Rastrelli, G. Hackett [et al.] // *Nat. Rev. Dis. Primers.* – 2019. – Vol. 5. – P. 38. – doi: 10.1038/s41572-019-0087-y.
145. Postpubertal Spermatogonial Stem Cell Transplantation Restores Functional Sperm Production in Rhesus Monkeys Irradiated Before and After Puberty / G. Shetty, J.M. Mitchell, T.N.A. Lam [et al.] // *Andrology.* – 2021. – Vol. 9, № 5. – P. 1603-1616. – doi: 10.1111/andr.13033.
146. Proteomic identification of sperm antigens using serum samples from individuals with and without antisperm antibodies / K. Nowicka-Bauer, M. Kamieniczna, J. Cibulka [et al.] // *Andrologia.* – 2016. – Vol. 48, № 6. – P. 693-701. – doi: 10.1111/and.12502.
147. Quantitative dna evaluation of the high carcinogenic risk of human papilloma viruses and human herpes viruses in males with fertility disorders / V.V. Evdokimov, V.A. Naumenko, Y.A. Tulenev [et al.] // *Voprosy Virusologii.* – 2016. – Vol. 61, № 2. – P. 63-68.
148. Rabijewski, M. The treatment of hypogonadism and maintenance of fertility in men / M. Rabijewski // *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego.* – 2016. – Vol. 40, № 237. – P. 198-201.
149. Rajender, S. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility / S. Rajender, K. Avery, A. Agarwal // *Mutation Res.* – 2011. – Vol. 727, № 3. – P. 62-71.
150. Reactive oxygen species and male reproductive hormones / M. Darbandi, S. Darbandi, A. Agarwal [et al.] // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2018. – Vol. 16. – P. 87. – doi: 10.1186/s12958-018-0406-2.

151. Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation / C. Cakici, B. Buyrukcu, G. Duruksu [et al.] // *BioMed. Res. Int.* – 2013. – 2013. – P. 529589.
152. Reestablishment of spermatogenesis after more than 20 years of cryopreservation of rat spermatogonial stem cells reveals an important impact in differentiation capacity / E.C. Whelan, F. Yang, M.R. Avarbock [et al.] // *PLoS Biol.* – 2022. – Vol. 20, № 5. – P. e3001618. – doi: 10.1371/journal.pbio.3001618.
153. Regenerative medicine for male infertility: A focus on stem cell niche injury models / G. Sagaradze, A. Monakova, N. Basalova [et al.] // *Biomed. J.* – 2022. – Vol. 45, № 4. – P. 607-614. – doi: 10.3389/fonc.2022.1006017.
154. Regulatory functions of microRNAs in male reproductive health: a new approach to understanding male infertility / A.B. Harchegani, H. Shafaghathian, E. Tahmasbpour, A. Shahriary // *Reprod. Sci.* – 2018. – Vol. 1. – P. 1933719118765972. – doi: 10.1177/1933719118765972.
155. Reproductive function in men with chronic prostatitis: disease history and microbiological risk aspects / V.A. Bozhedomov, A.V. Semenov, A.V. Konyshev [et al.] // *Urologiia (Moscow, Russia).* – 2015. – № 1. – P. 70-74, 76-78.
156. Ring, J.D. Current medical management of endocrine-related male infertility / J.D. Ring, A.A. Lwin, T.S. Köhler // *Asian J. Andrology.* – 2016. – Vol. 18, № 3. – P. 357-363.
157. Semen quality and alcohol intake: A systematic review and meta-analysis / E. Ricci, S. Al Beitawi, S. Cipriani [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2017. – Vol. 34. – P. 38-47. – doi: 10.1016/j.rbmo.2016.09.012.
158. Sertoli cell function in infertile patients with and without microdeletions of the azoospermia factors on the Y chromosome long arm / C. Foresta, A. Bettella, E. Moro [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* – 2001. – Vol. 86, № 6. – P. 2414-2419. – doi: 10.1210/jcem.86.6.7530.
159. Sertoli cell-mediated differentiation of male germ cell-like cells from human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in an in vitro co-culture system / L. Xie, L. Lin, Q. Tang [et al.] // *Eur. J. Med. Res.* – 2015. – Vol. 20. – P. 9.
160. Sertoli cells promote proliferation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in co-culture / F. Zhang, M. Lu, H. Liu [et al.] // *Indian J. Exp. Biol.* – 2016. – Vol. 54, № 5. – P. 309-314.
161. Shamsi, M.B. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility / M.B. Shamsi, S.N. Imam, R. Dada // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2011. – Vol. 28. – P. 1073. – doi: 10.1007/s10815-011-9631-8.
162. Short-term changes in hormonal profiles after laparoscopic ovarian laser evaporation compared with diagnostic laparoscopy for PCOS / M.L. Hendriks, T. König, T. Korsen [et al.] // *Human*

- Reprod.n (Oxford, England). – 2014. – Vol. 29, № 11. – P. 2544-2552. – doi: 10.1093/humrep/deu237.
163. Should diagnostic testicular sperm retrieval followed by cryopreservation for later ICSI be the procedure of choice for all patients with non-obstructive azoospermia / G. Verheyen, V. Verhaeue, L. Van Landuyt [et al.] // Hum. Reprod. – 2004. – Vol. 19, № 12. – P. 2822-2830. – doi: 10.1093/humrep/deh490.
164. Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management – meta-analyses / D. Santi, G. Spaggiari, M. Simoni // Reprod. Biomed. Online. – 2018. – Vol. 37. – P. 315. – doi: 10.1016/j.rbmo.2018.06.023.
165. Sperm quality improvement after natural anti-oxidant treatment of asthenoteratospermic men with leukocytospermia / P. Piomboni, L. Gambera, F. Serafini [et al.] // Asian J. Androl. – 2008. – Vol. 10. – P. 201. – doi: 10.1111/j.1745-7262.2008.00356.x.
166. Spermatogenesis after transplantation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in busulfan-induced azoospermic hamster / N. Karimaghahi, A. Tamadon, F. Rahmanifar [et al.] // Iran. J. Basic. Med. Sci. – 2018. – Vol. 21, № 7. – P. 660-667. – doi: 10.22038/IJBMS.2018.29040.7010.
167. Stem cell and niche development in the postnatal rat testis / B.Y. Ryu, K.E. Orwig, M.R. Avarbock, R.L. Brinster // Dev. Biol. – 2003. – Vol. 263, № 2. – P. 253-263.
168. Stepwise Proliferation and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Collagen Sponges under Different Microenvironments / J. Zheng, Y. Xie, T. Yoshitomi [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – Vol. 23, № 12. – P. 6406. – doi: 10.3390/ijms23126406.
169. Successful Human Spermatogonial Stem Cells Homing in Recipient Mouse Testis after In Vitro Transplantation and Organ Culture / M. Mohaqiq, M. Movahedin, Z. Mazaheri, N. Amirjannati // Cell. J. – 2019. – Vol. 20. – P. 513-520. – doi: 10.22074/cellj.2019.5675.
170. Surgery of male infertility: an update / G. Franco, L. Misuraca, M. Ciletti [et al.] // Urologia. – 2014. – Vol. 81, № 3. – P. 154-164. – doi: 10.5301/uro.5000088.
171. Silymarin protects from varicocele-induced damages in testis and improves sperm quality: evidence for E2f1 involvement / S.-M. Moshtaghion, H. Malekinejad, M. Razi, V. Shafie-Irannejad // Systems Biol. Reprod. Med. – 2013. – Vol. 59, № 5. – P. 270-280. – doi: 10.3109/19396368.2013.794253.
172. Tamoxifen is a potent antioxidant modulator for sperm quality in patients with idiopathic oligoasthenospermia / L. Guo, J. Jing, Y.M. Feng, B. Yao // Int. Urol. Nephrol. – 2015. – Vol. 47, № 9. – P. 1463-1469. – doi: 10.1007/s11255-015-1065-2.

173. Temporal trends in sperm count: A systematic review and meta-regression analysis / H. Levine, N. Jørgensen, A. Martino-Andrade [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2017. – Vol. 23. – P. 646-659. – doi: 10.1093/humupd/dmx022.
174. Testicular gene expression in cryptorchid boys at risk of azoospermia / F. Hadziselimovic, N.O. Hadziselimovic, P. Demougin, E.J. Oakeley // *Sex. Dev.* – 2011. – Vol. 5. – P. 49-59. – doi: 10.1159/000323955.
175. The impact of drugs on male fertility: A review / M. Semet, M. Paci, J. Saïas-Magnan [et al.] // *Andrology.* – 2017. – Vol. 5. – P. 640-663. – doi: 10.1111/andr.12366.
176. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017 / F. Zegers-Hochschild, G.D. Adamson, S. Dyer [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2017. – Vol. 108. – P. 393-406. – doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.06.005.
177. The micronutrient supplements, zinc sulphate and folic acid, did not ameliorate sperm functional parameters in oligoasthenoteratozoospermic men / M. Raigani, B. Yaghmaei, N. Amirjannti [et al.] // *Andrologia.* – 2014. – Vol. 46, № 9. – P. 956-962. – doi: 10.1111/and.12180.
178. The prevalence of Human Papilloma Virus (HPV) infection in the oligospermic and azospermic men / S. Nasser, S.H. Monavari, H. Keyvani [et al.] // *Med. J. Islamic Repub. Iran.* – 2015. – Vol. 29. – P. 272.
179. Thibier, M. World statistics for artificial insemination in cattle / M. Thibier, H.-G. Wagner // *Livest. Prod. Sci.* – 2002. – Vol. 74, № 2. – P. 203-212. – [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(01\)00291-3](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00291-3).
180. Timing the window of implantation by nucleolar channel system prevalence matches the accuracy of the endometrial receptivity array / E.J. Nejat, M. Ruiz-Alonso, C. Simón, U.T. Meier // *Fertil. Steril.* – 2014. – Vol. 102, № 5. – P. 1477-1481. – doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.07.1254.
181. Tissue Engineering of Rat Bladder Using Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Bladder Acellular Matrix / D.L. Coutu, W. Mahfouz, O. Loutochin [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 12. – P. e111966. – doi: 10.1371/journal.pone.0111966.
182. Tobacco smoking and semen quality in infertile males: a systematic review and meta-analysis / P.K. Bundhun, G. Janoo, A. Bhurtu [et al.] // *BMC Public Health.* – 2019. – Vol. 19. – P. 36. – doi: 10.1186/s12889-018-6319-3.
183. Transient scrotal hyperthermia affects human sperm DNA integrity, sperm apoptosis, and sperm protein expression / M. Rao, W. Xia, J. Yang [et al.] // *Andrology.* – 2016. – Vol. 4, № 6. – P. 1054-1063. – doi: 10.1111/andr.12228.



184. Transrectal microwave thermotherapy causing a short-time influence on sperm quality in Chinese chronic nonbacterial prostatitis patients / J.-X. Jin, H.Z. Wang, Z.X. Zhai [et al.] // *Asian J. Andrology*. – 2017. – Vol. 19, № 5. – P. 548-553. – doi: 10.4103/1008-682X.185852.
185. Treatment with human, recombinant FSH improves sperm DNA fragmentation in idiopathic infertile men depending on the FSH receptor polymorphism p.N680S: a pharmacogenetic study / M. Simoni, D. Santi, L. Negri [et al.] // *Hum. Reprod. (Oxford, England)*. – 2016. – Vol. 31, № 9. – P. 1960-1969. – doi: 10.1093/humrep/dew167.
186. Trofimenko, V. Fertility treatment in spinal cord injury and other neurologic disease / V. Trofimenko, J.M. Hotaling // *Translational Androl. Urol.* – 2016. – Vol. 5, № 1. – P. 102-116.
187. UK-Russia Researcher Links Workshop: extracellular vesicles - mechanisms of biogenesis and roles in disease pathogenesis / A.N. Kapustin, N. Kalinina, T. Lopatina [et al.] // *J. Extracellular Vesicles*. – 2015. – Vol. 4. – P. 28094. – doi: 10.3402/jev.v4.28094.
188. Unexplained male infertility: diagnosis and management / A. Hamada, S.C. Esteves, M. Nizza, A. Agarwal // *Int. Braz J. Urol.* – 2012. – Vol. 38, № 5. – P. 576-594. – doi: 10.1590/s1677-55382012000500002.
189. Using L- and acetyl-L-carnitines in combination with clomiphene citrate and antioxidant complex for treating idiopathic male infertility: a prospective randomized trial / V.A. Bozhedomov, N.A. Lipatova, G.E. Bozhedomova [et al.] // *Urologia*. – 2017. – Vol. 3. – P. 22-32. – doi: 10.18565/urol.2017.3.22-32.
190. Vander Borgh, M. Fertility and infertility: Definition and epidemiology / M. Vander Borgh, C. Wyns // *Clin. Biochem.* – 2018. – Vol. 62. – P. 2-10. – doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012.
191. Varicocele Is Associated with Impaired Semen Quality and Reproductive Hormone Levels: A Study of 7035 Healthy Young Men from Six European Countries / J. Damsgaard, U.N. Joensen, E. Carlsen [et al.] // *Eur. Urol.* – 2016. – Vol. 70. – P. 1019-1029. – doi: 10.1016/j.eururo.2016.06.044.
192. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen / W.H.O. – Sixth Edition. – 2021. – 292 p.
193. World Health Organization reference values for human semen characteristics / T.G. Cooper, E. Noonan, S. von Eckardstein [et al.] // *Hum. Reprod. Update*. – 2010. – Vol. 16. – P. 231. – doi: 10.1093/humupd/dmp048.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

## Приложение А

(справочное)

Патент № 2408378 С2

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 408 378** <sup>(13)</sup> **C2**

(51) МПК  
*A61K 31/7048* (2006.01)  
*A61K 38/21* (2006.01)  
*A61K 9/02* (2006.01)  
*A61K 9/06* (2006.01)  
*A61P 15/08* (2006.01)  
*A61H 19/00* (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2008105493/15, 15.02.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
15.02.2008

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.02.2008

(43) Дата публикации заявки: 27.11.2009 Бюл. № 33

(45) Опубликовано: 10.01.2011 Бюл. № 1

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: УДЖУХУ В.Ю. и др. Генферон в комплексном лечении хронического простатита. Текстовый документ от 2005 года. [Найдено 2008-11-26] Найдено из Интернет: <http://hghltd.yandex.com/> Сайт [www.school-25.ru/deistvuuscee-vercestvo-svechpo-lecheniu-hronicheskogo-prostatita-4235.shtml](http://www.school-25.ru/deistvuuscee-vercestvo-svechpo-lecheniu-hronicheskogo-prostatita-4235.shtml). RU 2073522 C1, 20.02.1997. US 6824993, 30.11.2004. US 7112410, 26.09.2006. (см. прод.)

Адрес для переписки:  
105082, Москва, а/я 111, Юридическая фирма "Лабзин и партнеры", С.М.Ломскому

(72) Автор(ы):  
Камалов Армаис Альбертович (RU),  
Ефремов Евгений Александрович (RU),  
Дорофеев Сергей Дмитриевич (RU),  
Охоботов Дмитрий Александрович (RU),  
Мельник Ярослав Игоревич (RU),  
Бедретдинова Дина Алиевна (RU),  
Уджуху Владислав Юсуфович (RU),  
Короткий Николай Гаврилович (RU),  
Кубылинский Александр Александрович (RU),  
Кубылинский Михаил Александрович (RU),  
Морозов Дмитрий Валентинович (RU),  
Иванов Роман Алексеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):  
Закрытое акционерное общество "БИОКАД" (RU)

RU 2 4 0 8 3 7 8 C 2

RU 2 4 0 8 3 7 8 C 2

## (54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ПРОСТАТИТА

(57) Реферат:  
Изобретение относится к медицине, а именно к урологии, и может быть использовано для лечения хронического бактериального простатита нехламидийной этиологии. Для этого используют комплексную терапию, включающую антибактериальную терапию и применение Интерферона  $\alpha$  в виде мазей или

суппозитория. Курс лечения проводится в течение 7 дней, повторный семидневный курс через неделю. Способ обеспечивает повышение эффективности лечения хронического простатита за счет применения интерферона, который оказывает не только иммуномодулирующее действие, но и способствует купированию симптоматических проявлений простатита. 3 з.п. ф-лы.

(56) (продолжение):  
ДОЛГУШИН И.И. и др. Использование циклоферона в терапии хронических хламидийных простатитов: Методические рекомендации для врачей. - Челябинск: 2006. с.31. УДЖУХУ В.Ю. Суппозитории. Генферон-высокоэффективный компонент комплексной терапии урогенитальных инфекций. Проблемы репродукции. - 2005. с.1-4. [Найдено 2009-05-26] Найдено из Интернет: <http://hghltd.yandex.com>). ROSTED P. Chronic prostatitis / chronic pelvic pain syndrome and acupuncture - a case

Приложение Б  
(справочное)

Патент № 2653779 С1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) **RU** (11) **2 653 779**<sup>(13)</sup> **С1**

(51) МПК  
А61М 5/00 (2006.01)  
А61К 35/28 (2015.01)  
А61Р 15/08 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
А61М 5/00 (2006.01); А61К 35/28 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016151258, 26.12.2016  
(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
26.12.2016  
Дата регистрации:  
14.05.2018  
Приоритет(ы):  
(22) Дата подачи заявки: 26.12.2016  
(45) Опубликовано: 14.05.2018 Бюл. № 14  
Адрес для переписки:  
119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1,  
Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова, Фонд "Национальное  
интеллектуальное развитие"

(72) Автор(ы):  
Ткачук Всеволод Арсеньевич (RU),  
Акопян Жанна Алексеевна (RU),  
Ефименко Анастасия Юрьевна (RU),  
Камалов Армаис Альбертович (RU),  
Кирпатовский Владимир Игоревич (RU),  
Макаревич Ольга Александровна (RU),  
Макаревич Павел Игоревич (RU),  
Нимирицкий Петр Петрович (RU),  
Охоботов Дмитрий Александрович (RU),  
Сагарадзе Георгий Дмитриевич (RU),  
Тарасова Елена Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования "Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ)  
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: САКИСИ С et al. Recovery of  
fertility in azoospermia rats after injection of  
adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells:  
the sperm generation. Biomed Res Int.  
2013:529589. RU 2117446 С1, 20.08.1998. RU  
2026643 С1, 20.01.1995. RU 2409665 С2,  
20.01.2011. CN 103074298 А, 01.05.2013. AU  
2011100703 А4, 21.07.2011. АЛЕКСЕЕВА И.  
С. Применение (см. прод.)

(54) СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и может  
быть использовано для стимуляции  
восстановления мужской фертильности, в том  
числе при врожденном или приобретенном  
нарушении функции сперматогенной ткани  
семенников. Способ стимуляции сперматогенеза  
включает инъекционное введение под белочную  
оболочку яичка суспензии мультипотентных

мезенхимных стромальных клеток жировой ткани  
человека в бессывороточной среде роста,  
лишенной ксеногенных компонентов, в  
количестве 500-600 тысяч клеток, содержащихся  
в 400±100 мкл суспензии. Способ обеспечивает  
высокую степень стимуляции сперматогенеза за  
счет активации эндогенных тканеспецифичных  
стволовых, прогениторных клеток и клеток,

RU 2 653 779 С1

RU 2 653 779 С1

Приложение В  
(справочное)

Патент № 2652902 С1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU (11)

2 652 902<sup>(13)</sup> С1

(51) МПК  
A61M 5/00 (2006.01)  
A61K 35/28 (2015.01)  
A61K 38/39 (2006.01)  
A61P 15/08 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
A61M 5/00 (2006.01); A61K 35/28 (2006.01); A61K 38/39 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016151259, 26.12.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
26.12.2016

Дата регистрации:  
03.05.2018

Приоритет(ы):  
(22) Дата подачи заявки: 26.12.2016

(45) Опубликовано: 03.05.2018 Бюл. № 13

Адрес для переписки:  
119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1,  
Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова, Фонд "Национальное  
интеллектуальное развитие"

(72) Автор(ы):

Ткачук Всеволод Арсеньевич (RU),  
Акопян Жанна Алексеевна (RU),  
Ефименко Анастасия Юрьевна (RU),  
Камалов Армаис Альбертович (RU),  
Кирпатовский Владимир Игоревич (RU),  
Макаревич Ольга Александровна (RU),  
Макаревич Павел Игоревич (RU),  
Нимирицкий Петр Петрович (RU),  
Охоботов Дмитрий Александрович (RU),  
Сагарадзе Георгий Дмитриевич (RU),  
Тарасова Елена Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования "Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ)  
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: AU 2011100703 A4, 21.07.2011. RU  
2026643 C1, 20.01.1995. RU 2409665 C2,  
20.01.2011. RU 2117446 C1, 20.08.1998. CN  
103074298 A, 01.05.2013. АЛЕКСЕЕВА И. С.  
Применение комбинированного клеточного  
трансплантата на основе мультипотентных  
мезенхимальных стромальных клеток  
жировой ткани: автореферат диссертации  
на соискание ученой доктора медицинских  
(см. прод.)

(54) СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и может быть использована для стимуляции сперматогенеза, в том числе при лечении нарушений фертильности, вызванных врожденной или приобретенной патологией ткани семенников. Способ стимуляции сперматогенеза включает введение под белочную оболочку яичка биоматериала, содержащего смесь из активного

компонента и основы. В качестве активного компонента использована кондиционированная среда, содержащая продукты секреции мультипотентных МСК человека. Среда включает факторы роста: GDNF в концентрации не менее 50 пкг/мл, VEGF в концентрации не менее 200 пкг/мл, FGF basic в концентрации не менее 0,3 пкг/мл. В качестве основы используют