

НАО «Медицинский университет Астана»

УДК 616.697-089.819.843:611.013.395

На правах рукописи

**ЖАНКИНА РАНО АМИРХАНОВНА**

**Возможности аутотрансплантации мезенхимальных стволовых клеток в  
лечении мужского бесплодия**

8D10102 – Медицина

Диссертация на соискание степени  
доктора философии (PhD)

Научный консультант  
кандидат медицинских наук,  
ассоциированный профессор  
У. Жанбырбекұлы

Научный консультант  
доктор медицинских наук,  
профессор  
М.Б. Аскарлов

Зарубежный консультант  
PhD, professor  
A. Tamadon

Республика Казахстан  
Астана, 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ</b> .....	4
<b>ОПРЕДЕЛЕНИЯ</b> .....	5
<b>ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ</b> .....	6
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	7
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ОБ ЭТИОЛОГИИ, ПАТОГЕНЕЗЕ, ДИАГНОСТИКЕ И ТАКТИКЕ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С НЕОБСТРУКТИВНОЙ АЗООСПЕРМИИ</b> .....	11
1.1 Эпидемиология мужского бесплодия.....	11
1.2 Этиология и патогенез мужского бесплодия.....	12
1.3 Микроделеция AZF локуса Y хромосомы у мужчин с необструктивной азооспермией.....	19
1.4 Ингибин В как главный предиктор мужского бесплодия.....	20
1.5 Азооспермия.....	21
1.6 Лечение необструктивной азооспермии.....	24
1.7 Биопсия яичка.....	25
1.8 Микрохирургическая экстракция сперматозоидов (micro-TESE) у мужчин с НОА.....	27
<b>2 ПОНЯТИЕ О СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ. ХАРАКТЕРИСТИКА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК. ПОНЯТИЕ О МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ</b> .....	29
2.1 Стволовые клетки, виды стволовых клеток, их роль в регенерации.....	29
2.2 Значение мезенхимальных стволовых клеток.....	32
2.3 Иммуномодулирующие свойства мезенхимальных стволовых клеток.....	32
2.4 Паракринные свойства мезенхимальных стволовых клеток.....	33
2.5 Свойства и функции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга.....	33
2.6 Среды, применяемые для культивации МСК.....	34
2.7 Маркеры мезенхимальных стволовых клеток.....	36
2.8 Проточная цитометрия.....	38
2.9 Трансплантация стволовых клеток и мужское бесплодие: современное состояние и перспективы развития.....	40
2.10 Показатели сперматогенеза после трансплантации МСК на животных-хомяках, индуцированных бусульфаном.....	41
<b>3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	43
3.1 Информация об участниках исследования и наборе данных.....	43
3.2 Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток аутологичного костного мозга.....	46
3.2.1 Этап 1 – миелоэксфузия.....	47
3.2.2 Этап 2 – изоляция мезенхимальных стволовых клеток.....	49

3.3	Оценка эффективности терапии.....	51
3.4	Методы исследования.....	52
3.4.1	Обследование перед началом исследования.....	52
3.4.2	Изучение фенотипа мезенхимальных стволовых клеток .....	52
3.4.3	Гистологическое исследование ткани яичек.....	55
3.4.4	Статистические методы обработки результатов.....	56
3.5	Дизайн исследования .....	57
	<b>4 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>58</b>
4.1	Методы обследования пациентов.....	60
4.2	Андрологическое исследование.....	60
4.3	Спермограмма.....	60
4.4	Гормональный профиль.....	61
4.5	Генетические исследования.....	61
4.6	Методы лечения.....	61
	<b>5 ЛЕЧЕНИЕ НОА.....</b>	<b>67</b>
5.1	Изменения гормонального профиля у пациентов с необструктивной азооспермией после аутотрансплантации МСК	67
5.2	Результаты применения различных методов стимулирующей терапии при необструктивной азооспермии.....	70
	<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>72</b>
	<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....</b>	<b>74</b>
	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ А – Авторское свидетельство.....</b>	<b>93</b>
	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Б – Информированное согласие на участие в исследовании .....</b>	<b>94</b>
	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ В – Информированное согласие пациента на проведение операции: миелоэкспузия (забор костного мозга).....</b>	<b>98</b>

## НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты: Приказ Министра образования и науки Республики Казахстан. О внесении изменений в приказ Министра образования и науки Республики Казахстан от 31 марта 2011 года, №127 «Об утверждении Правил присуждения степеней»: утв. 24 мая 2019 года, №230.

Государственный общеобязательный стандарт послевузовского образования: приложение 8 к приказу Министра образования и науки Республики Казахстан от 31 октября 2018 года, №604.

Приказ и.о. Министра здравоохранения и социального развития Республики Казахстан. Об утверждении государственных общеобразовательных стандартов и типовых профессиональных учебных программ по медицинским и фармацевтическим специальностям: утв. 31 июля 2015 года, №647.

Кодекс Республики Казахстан. О здоровье народа и системе здравоохранения: принят 24 июня 2021 года, №52-VII.

Хельсинкская декларация рекомендации для врачей, проводящих медико-биологические исследования с участием людей: принята в Хельсинки, 1964 г., пересмотрена Токио, 1975; Венеция, 1983 г., Гонконг, 1989 г.

ГОСТ 7.1-2003. Межгосударственный стандарт (с изменениями от 2006 года). Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

Клинический протокол диагностики и лечения «Мужское бесплодие. Азооспермия»: утв. экспертной комиссией по вопросам развития здравоохранения Министерства здравоохранения Республики Казахстан от 12 декабря 2013 года, №23.

Трансплантация аутологичных стволовых клеток: приложение 1 к клиническому протоколу диагностики и лечения по профилю «Трансплантология»: утв. объединенной комиссией по качеству медицинских услуг Министерства здравоохранения и социального развития Республики Казахстан от 10 ноября 2016 года, №15.

Клинический протокол оперативного и диагностического вмешательства «Аутологичная трансплантация костного мозга»: Экспертным советом РГП на ПХВ «Республиканский центр развития здравоохранения» МЗСР РК от 9 июля 2015 года, №6.

СТ ННМЦ ИСМ МИ. Методическая инструкция по заготовке, культивированию и трансплантации стволовых клеток костного мозга.

РИ-МУА-48-20. Требования к содержанию и оформлению PhD докторской диссертации.

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующим определением:

**Азооспермия** – отсутствие сперматозоидов в эякуляте.

**Ауто трансплантация** – трансплантация собственных органов и тканей, то есть взятых у больного и пересаженных ему же.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

МСК	– мезенхимальные стволовые клетки
КТ	– компьютерная томография
IL 2,4,6	– интерлейкин 2,4,6
TNF $\alpha$	– фактор некроза опухоли
РКИ	– рандомизированное контролируемое исследование
ВРТ	– вспомогательная репродуктивная технология
ОА	– обструктивная азооспермия
НОА	– необструктивная азооспермия
Micro-TESE	– микрохирургическая экстракция сперматозоидов из яичка
TESE	– тестикулярная спермоэкстракция
ICSI	– интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита
ЭКО	– экстракорпоральное оплодотворение
ЛГ	– лютеинизирующий гормон
ФСГ	– фолликулостимулирующий гормон
ИППП	– инфекции, передающиеся половым путем

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность.**

Бесплодие в супружеском браке является важнейшей медико-социальной проблемой, привлекая внимание многих исследователей к проблеме репродуктивного здоровья населения [1-8].

Бесплодие поражает примерно 15% пар репродуктивного возраста (Vij S.C., Sabanegh E.Jr., Agarwal A., 2018). Большая часть мужской причины бесплодия в супружеском браке колеблется от 18,8 до 39% (Winters B.R., Walsh T.J., 2014). Среди пациентов с бесплодием, приблизительно 10-15% имеют азооспермию (Cocuzza M., Alvarenga C., Pagani R., 2013).

Азооспермия воспринимается как отсутствие сперматозоидов в спермограмме и примерно выявляется у 1% мужчин и у 10-15% пациентов с бесплодием (Jarow J.P., Espeland M.A., Lipshultz L.I.).

Необструктивная азооспермия (НОА) возможно является причиной мужского бесплодия, которым без медикаментозной терапии не обойтись (Kumar R., 2013). Супружеским парам, выставленным диагноз необструктивная азооспермия, единственным и последним шансом иметь детей является тестикулярная спермоэкстракция с интрацитоплазматической инъекцией сперматозоида (TESE-ICSI) (Hendriks S., Dancet E.A., Meissner A., 2014). Но этот вид вмешательства имеет малый процент успеха, так как нахождение и обнаружение сперматозоидов в первом цикле проведения тестикулярной спермоэкстракции составляет лишь 56% (Dabaja A.A., Schlegel P.N., 2013). Супружеские пары с необструктивной азооспермией не имеют возможности клинически иметь своих детей и имеют возможность либо усыновить, либо использовать донорскую сперму (Chiba K., Enatsu N., 2016; Palermo G., Joris H., Devroey P.).

Преимущества ВРТ как интрацитоплазматические инъекции сперматозоидов (Palermo G., Joris H., Devroey P.), ЭКО поменяли подход к ведению таких пациентов с необструктивной азооспермией.

Результаты в биотехнологии повысили способности лечения мужчин с необструктивной азооспермией (Chiba K., Enatsu N., 2016).

Терапия мезенхимальными стволовыми клетками была признана как новая опция лечения необструктивной азооспермии (Cyranoski D., 2013). Lue et al. (2007) показали, что мезенхимальные стволовые клетки, полученные из костного мозга, пересаженные в яички животных, в частности крыс с бусульфаниндуцированной азооспермией, обусловили появление дифференциации в клетки Сертоли и Лейдига (Cyranoski D., 2013). В 2016 году, в исследовании, выполненном в Иордании было сообщено, что ученые ввели CD34+/CD133+ клетки интратестикулярно. После трансплантации больные находились под наблюдением в течение 5 лет. У данных больных не было никаких осложнений. У 9 из 27 пациентов были обнаружены изменения при гистологическом обследовании (Al Zoubi A.M., 2014).

Таким образом, основываясь на эти предпосылки, мы пришли к идее разработки стратегии для терапии необструктивной азооспермии с применением мезенхимальных стволовых клеток.

С практической точки зрения, результаты работы могут служить основой для применения нового клеточно-терапевтического подхода для лечения необструктивной азооспермии с помощью мезенхимальных стволовых клеток.

#### **Цель исследования.**

Оценить эффективность и безопасность применения аутологичных костномозговых мезенхимальных стволовых клеток в лечении необструктивной азооспермии.

#### **Объект и предмет исследования.**

В основу настоящего исследования легли 25 пациентов с диагнозом необструктивная азооспермия. Из 25 пациентов, только 19 пациентов согласно критериях включения, вошли в экспериментальное исследование в возрасте от 24 до 48 лет. Набор пациентов проводился последовательно в процессе амбулаторного приема. Это те пациенты, неоднократно обращавшиеся к урологам, андрологам, репродуктологам без положительного результата. Клиническое обследование пациентов было проведено на базах: клиника «ЭКОМЕД плюс», на базе Центра клеточных технологий, трансплантации и менеджмента института Фундаментальной и прикладной медицины АО «Национальный научный медицинский центр» (за период с 2019 по 2022 гг.).

Мезенхимальные стволовые клетки, полученные из 19 пациентов с НОА, ранее культивированные в Центре клеточных технологий, трансплантации и менеджмента были введены этим же пациентам через 2 недели во время проведения micro-TESE.

#### **Задачи исследования:**

1. Выделить мезенхимальные стволовые клетки пациентов с необструктивной азооспермией и исследовать их фенотипические свойства с помощью проточной цитометрии.
2. Оценить безопасность пути введения мезенхимальных стволовых клеток в ткань яичка у пациентов с необструктивной азооспермией.
3. Оценить регенеративный эффект мезенхимальных стволовых клеток на процесс сперматогенеза у пациентов с необструктивной азооспермией.
4. Изучить терапевтические эффекты мезенхимальных стволовых клеток на показатели гормонального фона у пациентов с необструктивной азооспермией.

#### **Методы исследования:**

1. Исследование лабораторных показателей и УЗИ мошонки (контроль).
2. Коагулограмма (протромбиновый индекс, протромбиновое время, фибриноген, АЧТВ).
3. Гормональный профиль (уровень тестостерона, ФСГ, ЛГ, пролактина, ингибин В).
4. Анализ на кариотипирование, микроделецию Y хромосомы.



5. Исследование на онкомаркеры: СА 19-9, СУFRA, ПСА (общий и свободный), АФП, S-100, РЭА, SCCA, СА 72-4.
6. ИФА: HBsAg, HBc.
7. Рентген грудной клетки.
8. УЗИ мошонки (локализация яичек, наличие воспалительных процессов).
9. УЗИ мочевого пузыря, простаты, объема остаточной мочи (по показаниям)
10. Биопсия яичка (количество сперматогониев, количество сперматоцитов).
11. Гистологическое исследование извитых канальцев яичка.
12. Оценка спермограммы в динамике через 6 месяцев.
13. Статистическая обработка данных.

#### **Научная новизна результатов исследования**

1. Разработан новый метод применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в лечении вторичной необструктивной азооспермии.
2. Доказано стимулирующее влияние аутологичных костномозговых мезенхимальных стволовых клеток на появление сперматогенеза у пациентов со вторичной необструктивной азооспермией.
3. В результате аутотрансплантации костномозговых мезенхимальных стволовых клеток выявлено снижение ФСГ, увеличение уровней тестостерона и ингибина В.

#### **Практическая значимость.**

Применение мезенхимальных стволовых клеток аутологичного костного мозга безопасно и отмечены регенеративные воздействия на сперматогенные эпителии у пациентов со вторичной необструктивной азооспермией.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Аутотрансплантация мезенхимальных стволовых клеток является безопасной и эффективной процедурой в лечении мужчин со вторичной необструктивной азооспермией.
2. Аутотрансплантация мезенхимальных стволовых клеток костного мозга вызывает повышение показателей тестостерона, ингибина В; снижение уровня ФСГ.
3. После аутотрансплантации костномозговых мезенхимальных стволовых клеток отмечена активизация сперматогенеза у пациентов со вторичной необструктивной азооспермией, подтверждением чего является обнаружение сперматозоидов.

#### **Публикации по теме диссертации:**

По материалам проведенного исследования опубликовано 6 статей: одна статья опубликована в журнале «Stem Cell Research and Therapy», имеющая 90 перцентиль (Q1) и статья в журнале «Urology», имеющая 25 перцентиль (Q4) по CiteScore в базе данных Scopus, 3 обзорные статьи в рецензируемых отечественных изданиях, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и образования МНВО РК и 1 статья в Российском журнале. Также опубликовано 7 публикаций в материалах международных научно-практических конференций (Казахстана, России, Канады, Мадрида,

Германии). Имеется 1 авторское свидетельство от 22.05.2020 №10124 (Приложение А)

**Вклад автора в проведение исследования:**

Во время исследования автор принимала участие в определении тематики диссертационной работы, формировании ее методологической структуры, формулировке цели и задач, сборе материалов исследования, самостоятельно провела статистический анализ и обобщение полученных результатов, осуществила клинико-лабораторную интерпретацию данных пациентов, анализ литературных данных по теме диссертационной работы.

Автор выступала в качестве ассистента в заборе костного мозга, культивировании, смены питательных сред. Самостоятельно и в качестве ассистента проводила биопсию яичка с введением мезенхимальных стволовых клеток интратестикулярно.

Автором подготовлены и опубликованы результаты исследований в журналах, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и образования МНВО РК, на международных научно-практических конференциях и зарубежных изданиях.

**Апробация материалов диссертации**

Основные положения диссертационной работы:

1. Mesenchymal stromal/stem cells and their exosomes for restoration of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia: a systemic review // Stem Cell Research and Therapy (2021) 12:229. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02295-9>.

2. Using mesenchymal stem cells for the treatment of non-obstructive azoospermia // Urology, 2020, №4, P. 119-123.

3. Современные аспекты мужского бесплодия (обзор литературы) // Валеология: Денсаулық - Ауру - Сауықтыру №4, 2019, стр.104-107.

4. Роль мезенхимальных стволовых клеток в лечении мужского бесплодия Astana Medical Journal 2019 № 4 (102), стр. 54-59.

5. Лечение необструктивной азооспермии с помощью мезенхимальных стволовых клеток. Клинический случай. Наука и Здравоохранение 2022 №4 (24), стр.240-245.

6. Фрагменты работы были представлены в виде тезиса на XII Global Science and Innovations 2021: Central Asia. International Scientific Practical Journal, Nur-Sultan, Kazakhstan, February.

7. Фрагменты работы были представлены в виде тезиса на «EurasiaScience» XLIII Международной научно-практической конференции, Moscow, Russia, February, 15, 2022.

8. Фрагменты работы были представлены в виде тезиса на Innovative Trends in Science, Practice and Education Proceedings of the VII International Scientific and Practical Conference Munich, Germany February 22 – 25, 2022

9. Фрагменты работы были представлены в виде тезиса на Prospects and Key Tendencies of Science in Contemporary World Proceedings of XVII International Multidisciplinary Conference March (Madrid, 2022).

10. Фрагменты работы были представлены в виде тезиса на Modern Problems In Science Proceedings of the X International Scientific and Practical Conference (Vancouver, Canada March 15-18, 2022).

11. Фрагменты работы были представлены в виде тезиса на “VESTNIK” of the South-Kazakhstan medicine academy REPUBLICAN SCIENTIFIC JOURNAL, № 4 (94), 2021, Том 6.

12. Участие в республиканской научно-практической конференции «Актуальные проблемы фармакологии Республики Казахстан», посвященной в честь 80-летия и памяти ученого-фармаколога, д.м.н., профессора Мухамбетова Д.Д., 12 ноября 2021, Нұр-Сұлтан.

13. Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells Restore Spermatogenesis in Male Non obstructive Azoospermia (literature review) // Biomedical Chemistry: Research and Methods. – 2021.

14. Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом от 22 мая 2020 года, №10124.

### **Объем и структура диссертации**

Материалы диссертации изложены на 93 страницах машинописного текста и включают введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, 5 разделов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающие отечественных и зарубежных источников, приложений. Работа иллюстрирована 16 таблицами и 31 рисунками.

# **1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ОБ ЭТИОЛОГИИ, ПАТОГЕНЕЗЕ, ДИАГНОСТИКЕ И ТАКТИКЕ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С НЕОБСТРУКТИВНОЙ АЗОСПЕРМИЕЙ**

## **1.1 Эпидемиология мужского бесплодия**

В течение многих лет тема «бесплодия» остается одной из главных и ведущих проблем в современной медицине и в обществе [9]. Частота увеличения бесплодия вызывает понижение рождаемости и снижение численности населения. Частота бесплодных браков в Российской Федерации согласно последним статистическим данным составляет до 19% [10]. В Республике Казахстан, к сожалению, нет регистра бесплодия, поэтому нет возможности предоставить точные данные.

Согласно статистическим данным - около 20% случаев, связанных с мужским фактором бесплодия, 50% с женским фактором [11]. Мужское бесплодие выявляется у 30% семейных пар [12]. Мужской фактор преобладает в 50% случаев бесплодия [13-16].

Согласно статистическим данным, примерно 8% мужчин репродуктивного возраста обращаются за медицинской помощью по поводу невозможности иметь детей. Среди половины мужчин со сниженной репродуктивной функцией мужской фактор является основной причиной. К снижению количества и качества сперматозоидов в сперме могут приводить эндокринные заболевания; различные генетические отклонения, воспалительные заболевания; злоупотребление наркотиками и алкоголем, отравление тяжелыми металлами. Отсутствие детей в супружеской паре может трактоваться как спектр физических, эмоциональных, социокультурных и финансовых проблем (Slade et al., 2007; Greil et al., 2010).

Согласно демографическим показателям мужским бесплодием страдает около 72,4 млн. мужчин по всему миру. Эта социокультурная проблема относится к распространенным андрологическим заболеваниям в развитых и развивающихся странах, которое поражает до 15% пар репродуктивного возраста [17-20]. Около 48,5 млн. семейных пар в современном мире не могут забеременеть после 5 лет совместной жизни без предохранения [21].

Диагноз «мужское бесплодие» не может быть выставлен согласно различным клинико-лабораторным показателям, которые докажут или опровергнут причину бесплодия. При отсутствии беременности на протяжении одного года без использования контрацептивов необходимо исследовать как мужскую, так и женскую фертильность. Необходим полный перечень дообследований, таких как: сбор репродуктивного анамнеза, оценка гормонального профиля, выполнение 2-х последовательных анализов эякулята с интервалом не более трех месяцев. Сбор репродуктивного анамнеза допускает наличие предикторов мужского бесплодия, таких как все оперативные вмешательства; прием лекарственных препаратов; ранее перенесенные заболевания. Особо уделяется наследственному анамнезу; заболеваниям,

передающимся половым путем; воспалительным заболеваниям в детстве (например, паротит). Объективное изучение проводится согласно схеме, опубликованной Всемирной Организацией Здравоохранения [22]. Воспалительные изменения в эякуляте снижают качество жизнеспособности сперматозоидов. ИППП могут создавать склеивание сперматозоидов, создавая обструкцию придатка и vas deferens, а также приводить к продукции токсичных свободных радикалов [23].

## 1.2 Этиология и патогенез мужского бесплодия

Мужской фактор бесплодия имеет различное количество причин, начиная от изменения образа жизни, приема лекарств, переохлаждений, различных факторов.

Пациенты, испытывающие воздействие следующих опасных веществ на производстве, таких как клей, растворители, силиконы, радиация могут быть бесплодны. Воздействие радиации может вызывать снижение производства сперматозоидов, а влияние большей части радиации приводит к полному бесплодию. Длительное воздействие высоких температур (чаще всего у пекарей) или сидения, подогрев сидений в автомобиле также могут негативно повлиять на мужскую фертильность [24].

Мужской фактор бесплодия может быть объединен с такими заболеваниями, как варикоцеле, крипторхизм, эндокринные заболевания, употребление алкоголя или химиотерапия, непроходимость семенных путей, инфекции [25, 26].

Если длительность отсутствия детей в браке превышает 4 года без применения защитных средств, то шанс зачать ребенка будет всего лишь 1,5% в месяц.

Важным аспектом в репродуктивной медицине является возраст женщины, так как данный аспект может определить окончательный результат [27].

*Существует несколько форм мужского бесплодия:*

*Идиопатическое мужское бесплодие* – показатели спермограммы в пределах нормальных значений, но мужчина бесплоден. Встречается в 10-20% случаев.

*Эндокринная причина* – врожденный дефицит ГнРГ (синдром Каллмана), синдром Лоуренса-Муна-Бейдла, синдром Прадера Вилли, семейная мозжечковая атаксия, травма головы, внутричерепное облучение, гипертиреоз или прием тестостерона.

*Генетические причины* – первичная цилиарная дискинезия, синдром Клайнфельтера, хромосомные аномалии.

*Врожденные урогенитальные аномалии* – дисфункция, отсутствие придатков яичка, неопущение яичков, врожденные аномалии семявыносящих протоков.

*Приобретенные урогенитальные аномалии* – двусторонняя орхиэктомия, варикоцеле, двусторонняя непроходимость или перевязка семявыносящего протока, эпидидимит.

*Иммунологическая причина* – гемосидероз, саркоидоз, туберкулез, грибковые инфекции.

*Инфекции мочеполовых путей* – заболевания, передающиеся половым путем (хламидиоз, гонорея, трихомониаз, микоплазмоз).

*Сексуальная дисфункция* – эректильная дисфункция, преждевременная эякуляция.

*Злокачественные новообразования* – опухоли яичек или надпочечников, которые приводят к избытку андрогенов, макроаденоме гипофиза.

Согласно этиологии, выделяют следующие причины мужского бесплодия: тестикулярные, претестикулярные и посттестикулярные [28]:

Претестикулярные причины (вторичная недостаточность яичек, гормональные нарушения):

- синдром Прадера-Вилли;
- синдром Каллмана (аносмический гипогонадотропный гипогонадизм);
- синдром Лоуренса-Муна-Бидля;
- нормосмический гипогонадотропный гипогонадизм.

Тестикулярные причины (патология яичек):

- синдром Дауна;
- синдром Кляйнфельтера;
- синдром Штейнера (миотоническая дистрофия);
- хромосомные транслокации;
- микроделеции Y хромосомы.

Пост-тестикулярные причины:

- синдром Юнга;
- врожденная двусторонняя агенезия отводящих протоков.

С целью исключения генетических, хромосомных аномалий у мужчин с нарушениями сперматогенеза необходимо проводиться генетическое обследование (Nieschlag E., Behre H.M., Nieschlag S. et al.).

Чаще всего ряд аномалий развития связан с мужским фактором бесплодия. У мужчин с олигозооспермией процент обнаружения генетических аномалий составляет 11%, а у пациентов с азооспермией составляет до 21% [29].

Общепринятость синдрома Кляйнфельтера составляет около 1:500 [30]. 10% мужчин с таким синдромом имеют хромосомный мозаицизм.

46, XX – синдром половой реверсии является вариацией синдрома Кляйнфельтера. Пациенты имеют кариотип 46, XX. Лечение мужского бесплодия у этих больных исключено.

Синдром Кальмана в 20% случаев связан со снижением уровня секреции ГнРГ, вызвано изменением в гене *KALIG-1*, находящееся в коротком плече X-хромосомы [31].

Частота обнаружения синдрома 47, XYY относится к частоте синдрома Кляйнфельтера [32]. По данным спермограммы преобладает либо

нормозооспермия, либо азооспермия. Показатели тестостерона и ЛГ у мужчин имеют нормальные показатели, а показатель ФСГ зависит от недостаточности герминогенных клеток.

Наследование миотонической дистрофии происходит по аутосомно-доминантному типу и его проявления различны. У 80% мужчин обнаруживается атрофия яичек. Период полового созревания сопровождается без особенностей, а нарушение тестикул развивается позже во взрослом возрасте. Клетки Лейдига в норме [33].

Синдром отсутствия яичек (двусторонняя анорхия) встречается не часто, приблизительно 1:20000 мужчин [34]. Вследствие повреждения сосудов, травмы, инфекций во внутриутробном периоде развития тестикулы могут быть повреждены. Гормоны ФСГ и ЛГ высокие, а показатель тестостерона низкий. Методов лечения нет.

Аплазия герминогенного эпителия (синдром наличия только клеток Сертоли) чаще всего возникает в результате различных генетических дефектов, врожденного отсутствия герминогенного эпителия [35]. Методов лечения не существует.

Радиационное излучение и гонадотоксины несут повреждающий результат на герминогенный эпителий. Циклофосфамид, применяемый в онкологии обладает токсическим эффектом на тестикулы. Спиринолактон, ципротерон, кетоконазол приводят к нарушению синтеза тестостерона, за счет чего развивается олигоспермия [36]. Героин, марихуана приводят к низким показателям тестостерона в венозной крови. Радиационное облучение приводит к повреждениям со стороны клеток яичек [37].

Заболевание свинкой (эпидемический паротит) может приводить к образованию орхита у 15-20% мужчин. В 10% случаев преобладает двустороннее воспаление тестикул. В последующем данное заболевание может приводить к атрофии яичек. Показатели спермограммы восстанавливаются 1/3 пациентов [38].

Крипторхизм является патологическим заболеванием и характеризуется неопущением яичка в мошонку. Согласно статистическим данным, оно выявляется в 2-5% случаев при рождении ребенка. Нахождении яичек в брюшной полости наблюдается в 20% случаев. Причин образования данной патологии множество: повреждение гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной системы внутриутробно; дисгенез яичка; снижение формирования яичек в результате влияния факторов внешней среды. Предполагается, что при хирургическом лечении, выполненном в раннем возрасте, есть шанс иметь положительный эффект на качество эякулята. Нет сомнений, что роль крипторхизма в развитии мужского бесплодия очень важна [39].

Варикоцеле является одной из причин развития мужского бесплодия, и является довольно частой причиной. Данный симптомокомплекс является гетерогенным заболеванием, обусловленным поражением гипоталамуса, приводящего к снижению или отсутствию секреции гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ); характеризуется нарушением развития репродуктивной сферы.

На данный момент мнения ученых разделились, одни ученые считают варикоцеле причиной мужского бесплодия, другие ученые опровергают данную гипотезу, но данная тема до сих пор является актуальной. Всего лишь 20% пациентов с подтвержденным диагнозом варикоцеле имеют проблемы с фертильностью; данное состояние возможно приводит к нарушению сперматогенеза [40].

Согласно литературным данным, варикоцеле относится к распространенным заболеваниям. При варикоцеле происходят расширения вен семенного канатика левого, иногда правого яичка; боль и дискомфорт в яичке, усиливающиеся после полового акта, после физической нагрузки; снижение фертильности. Данное заболевание определяется у 2-22% мужчин.

Варикоцеле чаще всего встречается у мужчин с бесплодием. Взаимосвязь между варикоцеле и мужским бесплодием до сих пор остается неизвестной, но в 25-40% случаев варикоцеле связывается со снижением объема яичек, патологической спермограммой со снижением функции клеток Лейдига [41]. Вопрос лечения варикоцеле с целью достижения беременности в супружеской паре до сих пор остается открытым [42].

Первичный гипогонадизм создается гипофизарными или гипоталамическими заболеваниями. Гормональные изменения могут быть точно диагностированы. Недостаточность со стороны эндокринной системы приводит к снижению выработки тестостерона и нарушению сперматогенеза за счет пониженной выработки ЛГ и ФСГ. Лечение согласно протоколу – использование хорионического гонадотропина.

Вторичный гипогонадизм может быть вызван некоторыми лекарственными препаратами, гормонами, ожирением, анаболическими стероидами [43].

Ось мужских репродуктивных гормонов состоит из гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы. Данная система имеет 3 важных компонента: гипофизарная, гипоталамическая и тестикулярная [44]. Ось контролирует репродуктивную и иммунную системы, управляет размножением, развитием [45]. Гонадотропин-рилизинг гормон (ГнРГ) высвобождается из гипоталамуса из экспрессирующих нейронов. Из передней части гипофиза выделяются ЛГ и ФСГ. Крайне важен уровень гормонального фона у мужчин, в связи с чем определяют уровни общего тестостерона, ЛГ, ФСГ, ингибина В, пролактина в венозной крови [46].

Гормональные нарушения являются частой причиной мужского фактора бесплодия. Если есть нарушения сексуальной функции, изменения спермограммы (<10 млн/мл), недоразвитие вторичных половых признаков, то необходимо исследовать гормональный статус. Исследуются уровни ФСГ (нормальные показатели: 1,5-12,4 мМЕ/мл), общего тестостерона (нормальные показатели: 2,80-8,00 нмоль/л), ЛГ (нормальные показатели: 1,7-8,6 мМЕ/мл), пролактина (нормальные показатели: 4,6-21,4 нг/мл), ингибина В (нормальные показатели: 25-325 пг/мл). Расчет общего и свободного тестостерона необходим при обнаружении симптомов гипогонадизма. При подозрении на опухоль



гипофиза необходимо определить уровень пролактина. Нормальный показатель уровня ФСГ выявляется у многих мужчин при существенных изменениях сперматогенеза. Повышенные показатели гормона ФСГ чаще всего означают нарушение сперматогенеза.

В течение долгого времени изучается и обсуждается система образования мужского бесплодия, то есть образование антиспермальных антител (АСА). Эти антитела имеют возможность образовываться вследствие обструкции половых путей, травмы, вазэктомии, опухоли или перекрута яичка, инфекционного поражения [47]. До настоящего времени не ясна роль АСА в развитии мужского бесплодия. Этой аномалией страдает 1% мужчин и является составляющей частью 20% случаев причин мужского бесплодия [48].

Исследование пациентов с подозрением на мужское бесплодие начинается с анализа эякулята. Показатели спермограммы должны включать в себя: наличие или отсутствие сперматозоидов, концентрацию их, подвижность, если таковые имеются [49].

Сперматогенез является 74-дневным процессом, который очень важен для последней дифференциации сперматогониальных стволовых клеток в сперматозоиды. Сам сперматогенез включает три функциональные фазы, которые протекают в семенных канальцах яичек: митоз, мейоз и спермиогенез. Для продуктивного сперматогенеза необходим ряд сложнейших химических факторов, которые нуждаются в совершенном сотрудничестве между половыми клетками, эпителиальными канальцевыми клетками, клетками Сертоли и целостностью гематоэнцефалического барьера [50, 51].

Сперматогенез – это развитие мужских половых клеток в семенной ткани из диплоидной сперматогонии, приводящее к освобождению гаплоидных разделившихся половых клеток в семенные канальцы. Каждый цикл сперматогенеза у мужчины составляет 74 дня [52]. Полученные результаты спермограммы сообщают сведения о данном состоянии придатков яичек, придаточных половых желез и семенных канальцев (Esteves, 2014).

Сперматогенез объединен с плазматическим восстановлением и дифференциацией, проходит под управлением специальных генов увеличивающих гамет, а также контролирует соединение гормонов, цитокинов и факторов роста [53]. За сутки в яичке образуется примерно 100–200 миллионов сперматозоидов [54]. В эякулят поступает довольно малое количество сперматозоидов, за счет не полной их потери в семявыносящих путях и в яичке. В семявыносящих путях, возникает созревание и скопление данных клеток [55]. Ключевую роль в диагностике мужского бесплодия занимает сперматогенез [56, 57].

Данный цикл является непростым методом, с помощью чего сперматогониальные стволовые клетки обновляются и разделяются в гаплоидные сперматозоиды. Эти стволовые клетки находятся в яичке мужчин и защищают сперматогенез [58].

Сперматогониальные стволовые клетки представляют собой дифференцированные сперматогонии, которые приводят как к дифференцировке

сперматогонии, так и к обновлению для поддержания пула стволовых клеток. Сперматогониальные стволовые клетки являются возможными средствами для лечения мужского бесплодия из-за возможности возродить мужскую фертильность *in vivo* и возможности перераспределяться в мужские гаметы *in vitro* [59, 60]. Сперматогониальные клетки локализуются в семенных канальцах, находящихся рядом с базальной мембраной [61]. В некоторых клинических исследованиях различие транспортировки *in vitro* со следующей трансплантацией *in vivo* была произведена для приобретения мужских гамет на стадиях дифференцировки [62].

Согласно последним литературным данным, существуют всеобразные мнения о механизмах поражающего процесс сперматогенеза: токсическое воздействие; механическое сдавление семявыносящих путей варикозно-расширенными венами; гипоксия тестикул за счет застоя крови в венах семенного канатика; повышение температуры в области яичек; повреждение гемато-тестикулярного барьера с развитием аутоиммунных процессов при травмах яичек и воспалительных процессах [63-65]; сниженной выработке андрогенов клетками Лейдига [66, 67].

Нормализация сперматогенеза происходит в два важных этапа: эндокринный и гормональный; аутокринный и паракринный. Многие научные исследования продемонстрировали, что ФСГ и общий тестостерон обязательны для удачного окончания цикла сперматогенеза [68].

Сперматогенез делится на 4 этапа:

- 1) дифференциация сперматогониальных клеток и митотическая пролиферация, преобразуются сперматоциты;
- 2) мейотическое расщепление сперматоцитов, образующих к сперматидам, то есть к мейозу;
- 3) превращение круглых сперматид в зрелые сперматиды;
- 4) выход усиленных сперматид в просвет, то есть сперматогенез [69].

Деятельность цикла сперматогенеза осуществляют клетки Лейдига и Сертоли, обладающие рецепторами к ЛГ и ФСГ гормонам, поэтому снижение мужской фертильности возможно взаимосвязано с понижением выработки или активности ЛГ и ФСГ гормонов, или мутациями, которые прерывают работу их рецепторов [70].

Главным и основным мужским гормоном является тестостерон, вырабатываемый клетками Лейдига, нормализующий сперматогенез, обеспечивающий дифференциацию сперматоцитов, сперматогониев и спермиогенез [71]. Последовательное превращение холестерина в тестостерон происходит под действием 5 различных ферментных систем и различные трансформации на разном этапе приводят к снижению полового влечения, андрогенной недостаточности и мужскому бесплодию [72].

Сперма имеет две основные части: это сперматозоиды, которые продуцируются семенными канальцами яичек, и семенная жидкость, которая формируется вспомогательными железами, насыщающими сперму и исполняющими важную роль в содействии с женским репродуктивным трактом

для воздействия на фертильность [73]. Данные части отпечатываются в анализе эякулята объемом спермы, который показывает количество полученной семенной жидкости и количество сперматозоидов, выдающие определенное количество сперматозоидов в образце спермы [74].

Клетки Сертоли являются составной частью гемато-тестикулярного барьера и располагаются на базальной мембране извитого семенного канальца. В этом канальце объем клеток Сертоли доходит до 7% от всего числа общих клеток. Клетки Сертоли выделяют и создают прежде всего большое множество факторов, охватывающих цитокины, белки, стероиды, факторы роста, простагландины, модуляторы клеточного деления. Они управляют процессом сперматогенеза, предоставляющий формирование половых клеток от стволовых сперматогоний до зрелых сперматид. Научно доказано, что мужские половые клетки способны действовать на функционирование клеток Сертоли [75, 76].

Клетки Сертоли выделяют множество пептидов, которые влияют на клетки Лейдига. Два белка: активин и ингибин, увеличивают экспрессию рецепторов ЛГ клетками Лейдига и активируют стероидогенез. Индуктором синтеза этих белков в клетках Сертоли является хорионический гонадотропин. Превратившиеся коэффициенты роста  $\alpha$  и  $\beta$  снижают стероидогенез в клетках Лейдига. Сперматогонии тормозят синтез эстрадиола и активизируют синтез ингибина в клетках Сертоли. Сперматиды и сперматоциты II порядка активизируют деятельность ФСГ на клетки Сертоли [77].

Цитокины являются канальцевыми клеточными белками, имеющими небольшую массу, обладающие провоспалительным действием на соседние клетки-мишени и метаболизирующиеся иммунными клетками. Цитокины принимают участие в регуляции, то есть создают дифференциацию клеток, разрастание и регуляцию [78, 79].

Интерфероны обладают иммунорегуляторным и антипролиферативным эффектами. Перитубулярные клетки и клетки Сертоли высвобождают большое количество интерферонов I-го типа [80].

Среди факторов роста основной во влиянии на физиологию семенников составляет инсулиноподобный фактор роста (IGF), вырабатываемый под воздействием хорионического гонадотропина человека. Превратившиеся показатели роста бета и альфа, вырабатываемые клетками Сертоли, тормозят стероидогенез в клетках Лейдига, влияя на экспрессию рецепторов ЛГ.

Формирование трансформирующих показателей роста в клетках Сертоли тормозится ФСГ гормоном. Половые клетки и клетки Сертоли вырабатывают FGF-подобные белки.

Клетки Сертоли представляют собой одни из единственных клеток в семенных канальцах, вырабатывающие фактор стволовых клеток [81]. Выработка фактора стволовых клеток в семенниках состоит под контролем ФСГ. Фактор стволовых клеток считается важным регулятором; играет важную роль в адгезии, пролиферации, миграции, выживании сперматогоний и эмбриональных стволовых клеток [82]. Клетки Сертоли вырабатывают гликопротеины,

содержащие маннозу-6-фосфат для транспортировки их за пределы гематотестикулярного барьера [83].

УЗИ исследование мошонки определяет размеры яичек, их консистенцию; расширение, увеличение протоков яичка и придатков, структуру яичек, рефлюкс крови в яичковую вену, участков флюктуации и размягчения.

Трансректальное ультразвуковое исследование (ТРУЗИ) производится у больных, у которых подозревается дистальная обструкция. Причинами обструктивной азооспермии являются кисты предстательной железы, а также рубцевание эякуляторного протока [84].

Молекулярно-генетическая диагностика является важным диагностическим методом, который необходим для мужчин, чтобы обнаружить генетические факторы и обнаружить шансы мужчин на успешную биопсию [85-89].

### **1.3 Микроделеция AZF локуса Y хромосомы у мужчин с необструктивной азооспермией**

Данные многочисленных научных исследований, причастных к понятию о роли генетических факторов в этиологии мужского бесплодия, доказывают одно из ведущих мест среди нарушений в репродуктивной системе у мужчин [90, 91]. Наиболее частой генетической причиной мужского бесплодия считается микроделеция Y-хромосомы, захватывающая локус AZF.

Микроделеция – частичная потеря части хромосомы, которая обычно касается нескольких генов, но обладает меньшим размером и не обнаруживается обычными цитогенетическими способами, например, как кариотипирование [92, 93].

Распространенность данной мутации среди мужчин широко распространяется в среднем на 7,6 % [94, 95]. Делеции AZF-локуса чаще всего связана с блоком или снижением сперматогенеза до полного отсутствия половых клеток в семенных канальцах [96, 97]. С помощью цитогенетической диагностики микроделеции Y-хромосомы, появилась возможность обнаружения у 10-15 % мужчин с азооспермией [98, 99].

Длинное плечо Y-хромосомы имеет область Yq11, в которой находятся 26 генов, необходимые для участия в нормализации сперматогенеза [100-102]. Данную область обозначают AZF (azoospermia factor), поскольку микроделеции, находящиеся часто связаны с азооспермией. Выявлено 3 участка AZF, имеющие название AZFa, AZFb и AZFc [103]. Микроделеции в участке AZF обнаруживаются у 10% пациентов с необструктивной азооспермией [104]. Микроделеция в участке AZFa обозначает нулевые шансы на успешный исход биопсии тестикул [105, 106].

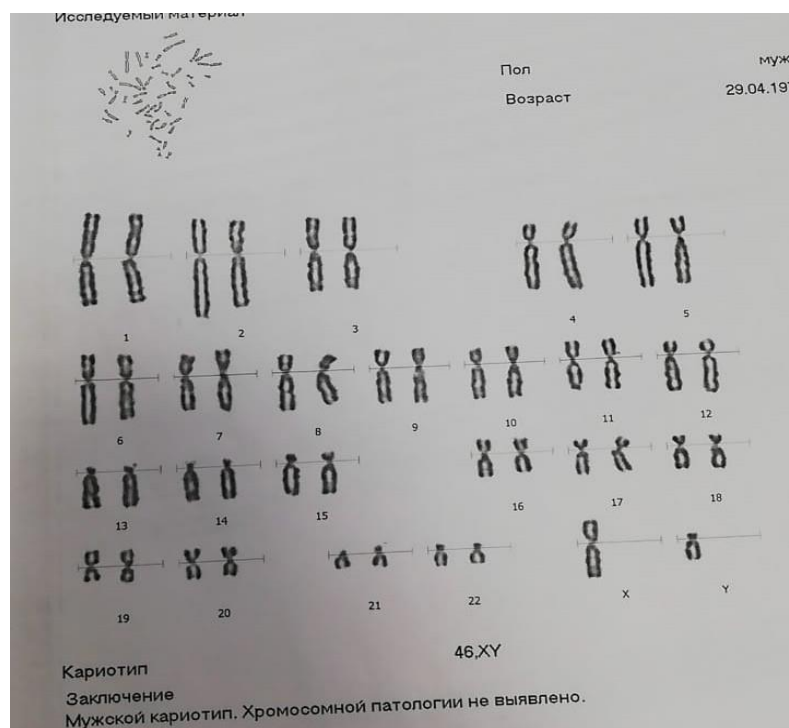


Рисунок 1 – Кариотипирование

Примечание – Мужской кариотип

На рисунке 1 представлен генетический анализ в норме.

В данной таблице 1 представлены показатели спермограммы в норме.

Таблица 1 – Анализ эякулята

Критерий ВОЗ (2012)	Нижняя граница показателя
– объем эякулята (мл)	1,5 (1,4-1,7)
– общее количество сперматозоидов	39 (33-46)
– концентрация сперматозоидов ( $10^6$ в мл)	15 (12-16)
– общая подвижность (категория A+B) %	40 (38-42)
– жизнеспособность (количество живых сперматозоидов) %	58 (55-63)
– морфология (нормальные формы) %	4 (3-4)
– pH	>7,2
MAR-тест (подвижные сперматозоиды, покрытые антителами) %	<50

#### 1.4 Ингибин В как главный предиктор мужского бесплодия

Мужское бесплодие представляет собой многофакторный синдромокомплекс, который имеет огромный выбор расстройств, касающихся таких систем, как кровеносная, половая, нервная, иммунная [107].

Важным критерием является гормональный статус пациента. В связи с чем определяют уровни ЛГ, ФСГ, общего тестостерона в венозной крови. В связи с этим возникла необходимость в установлении предикторов сперматогенеза в

венозной крови. Ранее таким маркером был ФСГ гормон, но он являлся зависим от функции гипоталамуса.

Одним из маркеров, который может судить о функциональном состоянии паренхимы яичек является ингибин В. Ингибин В вырабатывается клетками Сертоли и сперматогенными клетками в семенных канальцах яичек. Данный гормон является гликопротеином, имеющим две составляющие -  $\alpha$  и  $\beta$ , объединенные друг с другом дисульфидными связями [108]. Ингибин В контролирует выделение ФСГ по закону отрицательной обратной связи, удерживает выработку ФСГ в гипофизе [109]. Ученые, такие как Anawalt B.D. обнаружили, что повышенный показатель уровня ФСГ и низкая дозировка ингибина В у тех больных, кому верифицировали диагноз «бесплодие» [110]. Содержание ингибина В прямо зависит от функции яичек [111]. Выработка ингибина В во многом зависит от цикла сперматогенеза и показателя уровня ФСГ [112]. Показатель уровня ингибина В меньше 25 пг/мл подтверждает об изменений в репродуктивной системе у мужчины [113].

В данный момент исследуются материалы, изучающие репродуктивную важность маркера ингибина В в обследовании пациентов с мужским бесплодием. В 2012 году S.M. Manzoor et al. подтвердили положительную взаимосвязь между уровнем в крови ингибина В и количеством сперматозоидов в эякуляте. У пациентов с аплазией герминативного эпителия (Сертоли-клеточный синдром) в венозной крови выявляется низкий уровень ингибина В [114].

По данным Belva F., Roelans M., De Schepper J. (2017), концентрация ингибина В у больных с нарушенным сперматогенезом ниже, чем у фертильных мужчин. Достоверная положительная корреляция между количеством сперматозоидов в эякуляте и уровнем ингибина В подтверждена в исследовании Manzoor S.M. и соавт. [115]. Некоторые авторы используют уровень ингибина В как фактор прогноза эффективности получения сперматозоидов с помощью чрескожной аспирации [116].

Таким образом, определение ингибина В, а также его вклад в оценку эффективности терапии и прогноза лечения, становится важным этапом и ценным методом диагностики мужского бесплодия.

### **1.5 Азооспермия**

Одна из наиболее сложных и тяжелых форм для лечения мужского бесплодия является азооспермия.

Генетические аспекты азооспермии включают хромосомные аномалии (структурные или численные aberrации половых, или аутосомных хромосом), поражающие 5% мужчин с диагнозом бесплодие и 16% мужчин с подтвержденной азооспермией [117, 118].

Азооспермия обозначается как отсутствие сперматозоидов, клеток сперматогенеза в эякуляте. Заболеваемость азооспермии в численности пациентов составляет около 1 %, среди пациентов с бесплодием – 10-15 % [119, 120].

Чаще всего азооспермия связана с несколькими необратимыми изменениями в работе тестикул, которые влекут к подавлению сперматогенеза [121]. Такие изменения связаны с эндокринными, генетическими, воспалительными заболеваниями.

Существует два вида азооспермии: первый вид – это когда сперматогенез протекает в пределах нормы, но происходит обструкция семенных протоков, в результате чего происходит нарушение сперматогенеза в 40 % случаев [122]. При обструктивной азооспермии (ОА) определяется сохранность сперматогенеза [123-125]. При ОА сперматозоиды не в состоянии попасть в семенную жидкость из-за отсутствия семявыводящих протоков или непроходимости. К нарушению обструкции протоков могут приводить воспалительные, инфекционные заболевания; травмы; варикоцеле или врожденные аномалии мочеполовой системы. Обструктивную азооспермию диагностируют на основании анамнеза, данных физикального осмотра, данных клинко-лабораторных исследований, генетических методов обследования.

Второй вид – необструктивная азооспермия (НОА), когда азооспермия обусловлена сперматогенной недостаточностью [126], которая характеризуется как полное отсутствие сперматозоидов в эякуляте вследствие повреждения сперматогенеза. Это самая сложная и тяжелая форма мужского бесплодия.

Причина развития необструктивной азооспермии содержится в повреждении сперматогенеза из-за аномального повреждения деятельности яичек или из-за низкой выработки гонадотропинов. Под НОА часто подразумевают тяжелые, порой необратимые нарушения, такие как генетические (синдром Клайнфельтера, микроделеции Y-хромосомы); осложнения инфекций (орхит при паротите); врожденные (крипторхизм, аплазия яичек); травма яичек.

Дифференциальная диагностика ОА и НОА является важным этапом [127-130]. Ее проводят с помощью пальпации яичек, по которым определяют консистенцию, объем яичек; измеряют уровни ФСГ, ЛГ, общего тестостерона, ингибина В; проводят генетические исследования – кариотипирование, Y-хромосомную микроделецию [131]. Наличие в анамнезе у пациента таких причин, как неопущение яичка, противоопухолевая химиотерапия создает повреждение сперматогенеза. Прием препаратов, таких как стероиды [132], ингибиторы 5 $\alpha$ -редуктазы [133] также могут приводить к нарушению сперматогенеза.

Измерение объема яичек с помощью УЗИ метода или орхидометра имеет огромную ценность для точной установки диагноза: Необструктивная азооспермия. Размер тестикул воспроизводит точный уровень сперматогенеза, в связи с чем небольшие по объему тестикулы указывают на нарушения сперматогенеза.

Установленный диагноз обязан быть доказанным центрифугированием двумя экземплярами эякулята в течение 15 мин при комнатной температуре с быстротой центрифугирования не менее 3000 g [134-136].

Анализ эякулята должен соответствовать руководящим принципам ВОЗ (2012).

Лечение ОА предусматривает хирургическое вмешательство с целью улучшения проходимости семявыносящего тракта или микрохирургическую аспирацию/экстракцию сперматозоидов из яичка [137].

При обструктивной азооспермии хороший процент успеха реконструктивных операций за счет проходимости семявыносящих путей [138, 139]. При такой патологии, как необструктивная азооспермия тестикулы пациентов примерно составляют менее 15 см<sup>3</sup> [140]. УЗИ органов мошонки определяет не только объем яичек, но и устанавливает физиологические изменения в яичках. Микролитиаз в яичках выявляется с помощью УЗИ методов исследования. Микролитиаз связан с нарушением сперматогенеза [141].

По данным современной литературы попытки обнаружения сперматозоидов при открытой биопсии яичка при TESE (testicular spermatozoa extraction) у пациентов с НОА приравниваются к 45 % (Schlegel P.N., 1999, Okada H. et al., 2002). А вот возможность обнаружить сперматозоиды с помощью micro-TESE при необструктивной азооспермии составляет от 43-63 % (Schlegel P.N., 1999, Tsujimura A. et al., 2002).

При НОА проводят лечение гипогонадотропного гипогонадизма [142, 143].

При отсутствии положительных результатов выполняют хирургическое лечение в объеме micro-TESE [144-148]. Полученные при micro-TESE живые сперматозоиды нужны для ICSI (интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в яйцеклетку), который представляет собой единственный метод лечения НОА [149]. До выполнения ICSI необходимо выполнить генетические обследования мужчин для оценки вероятности формирования врожденных заболеваний у будущего ребенка.

Изъятие сперматозоидов возможно при проведении биопсии тестикул, в дальнейшем использование их в процедуре ICSI [150, 151].

При неэффективности манипуляций рекомендуют использовать программы вспомогательных технологий с использованием донорских сперматозоидов [152].

При повышении уровня ФСГ, ингибина В при небольшом объеме яичек можно предполагать необструктивный характер заболевания [153].

Когда выставляется диагноз необструктивная азооспермия, необходимо проводить дифференциальную диагностику между экзогенными факторами (цитотоксические препараты, лекарства, тепло, радиация); постишемическими (перекрут семенного канатика); посттравматическими; поствоспалительными (орхит); атрофией яичек; системными заболеваниями (почечная недостаточность, цирроз печени); варикоцеле; опухолями яичек.

Диагноз азооспермии указывают по нескольким спермограммам, так как возможна транзиторная азооспермия, связанная с факторами окружающей среды, воздействием токсических веществ, инфекциями [154, 155].

При лечении мужчин с бесплодием с НОА многие врачи сталкиваются с рядом проблем: это и нахождение возможностей успешной биопсии; это и выбор оптимального способа получения сперматозоидов, результативность программ



вспомогательных репродуктивных технологий, а самое главное - рождение здорового ребенка. Необходимо обследовать таких пациентов согласно четкому алгоритму ведения таких больных.

Лечение мужского бесплодия остается очень важной и актуальной темой 21 века, решение которой имеет не только медицинское, но и психосоциальное значение. Верное понимание патологических процессов, лежащих в основе нарушений мужской фертильности, очень важно, так как к нарушению качественных и количественных параметров эякулята приводят разнообразные этиопатогенные факторы, патогенетические механизмы.

Лечение НОА колеблется от медикаментозного лечения до вспомогательных репродуктивных технологий. Для диагностирования мужской фертильности главным способом обследования является спермограмма, данные гормональных обследований, генетические маркеры и биопсия яичек.

В настоящее время способы лечения для мужчин с бесплодием делятся на несколько групп: оптимизация производства спермы, облегчение обструкции, хирургическое извлечение спермы [156].

## **1.6 Лечение НОА**

### *Методы гормональной стимулирующей терапии сперматогенеза*

При первичном гипогонадизме лечение для стимуляции сперматогенеза без эффекта [157]. На сегодняшний день из медикаментозной терапии для гормональной терапии применяются: хорагон; хорионический гонадотропин (прегнил); антиэстрогены (кlostилбегит); рекомбинантные препараты ФСГ (Гонал Ф) и ЛГ (люверис). Эффективность препаратами антиэстрогенами или гонадотропинами будет, когда показатели ЛГ и ФСГ ниже или в пределах нормы [158].

### *Антиэстрогены*

Положительное применение кlostилбегита на восстановление мужской фертильности было описано Ross в 1980 г. [159].

Цитрат кломифена относится к селективным модуляторам рецепторов эстрогенов, блокирующих неблагоприятную обратную связь на уровне гипоталамуса и гипофиза. Этот препарат является смесью двух изоформ – это энкомифена и зукломифена [160].

Согласно научным исследованиям доказана эффективность применения кломифена цитрата у мужчин с НОА при подготовке к ВРТ (Hussein A. et al., 2005). Применение кломифена цитрата определило статистически повышение количества положительных случаев нахождения сперматозоидов при экстракции у мужчин с НОА [161], за счет того, что антиэстрогены встраиваются в отрицательную обратную связь половых гормонов на уровне гипофиза и гипоталамуса, стимулируя эндогенную выработку гонадотропин – релизинг гормона гипоталамусом, ЛГ и ФСГ гипофизом [162, 163]. ЛГ и ФСГ стимулируют клетки Лейдига в тестикулах, увеличивая продукцию тестостерона, за счет чего происходит стимуляция сперматогенеза.

Неблагоприятная обратная связь поддерживает дифференциацию ЛГ и ФСГ гормонов из передней доли гипофиза [164].

В исследовании Hussein A. (2013) выполняли стимуляцию сперматогенеза у мужчин с НОА для получения сперматозоидов, необходимых для ICSI. 496 мужчин получали кломифен цитрат в дозе: 50 мг в день; 116 мужчин относились к контрольной группе, их сперматозоиды были извлечены с помощью micro-TESE и они не получали медикаментозного лечения. Ученые доказали, что при подготовке к micro-TESE могут быть применены все виды лечения с незначительной разницей при концентрации сперматозоидов [165].

#### *Препараты хорионического гонадотропина (ХГЧ)*

Хорионический гонадотропин человека является эквивалентом ЛГ, активизирующий производство общего тестостерона в интратестикулярных клетках Лейдига [166]. ХГЧ увеличивает показатели сывороточного и интратестикулярного тестостерона, а также усиливает сперматогенез [167].

Положительный эффект использования ХГЧ дало при НОА у мужчин в качестве подготовки к micro-TESE [168, 169]. 28 пациентов в НОА получали ХГЧ. Из 28 пациентов, у 6 пациентов (21%) были обнаружены сперматозоиды.

### **1.7 Биопсия яичка**

Биопсия тестикул показана при всех видах азооспермии, а также при необструктивной азооспермии. Биопсию яичка используют для получения сперматозоидов из ткани яичка с дальнейшим проведением вспомогательных репродуктивных технологий, то есть интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов в яйцеклетку или экстракорпорального оплодотворения.

При биопсии оценивают гистологическую картину биоптата: гипосперматогенез; аплазию половых клеток; склероз канальцев [170].

Пациентам выполняют биопсию яичек с дальнейшим морфогистологическим анализом биоптатов. Ткань яичка подвергается стандартной гистологической очистке с окрашиванием срезов эозином и гематоксилином. В тканях яичка при гистологическом исследовании имеются достоверные изменения в извитых канальцах яичек: гипоплазия извитых канальцев (диаметр уменьшен в 1,5-2,0 раза; фиброзирование базальной мембраны с волокнистым компонентом ( $p < 0,05$ )) (рисунок 2). Эти извитые канальцы заполнены недифференцированными клетками Сертоли с различимыми ядрышками (рисунок 3). Базальные отсеки вакуолизированные, сперматогониальные клетки отсутствуют.

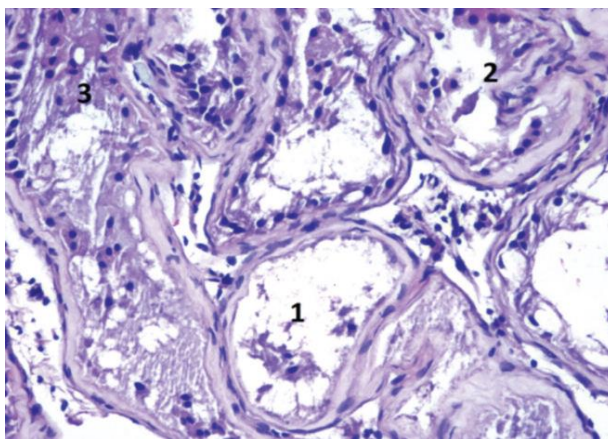


Рисунок 2 – Биоптат ткани яичка (склерозированные семенные канальцы с участками гипотрофии сперматогенного эпителия)

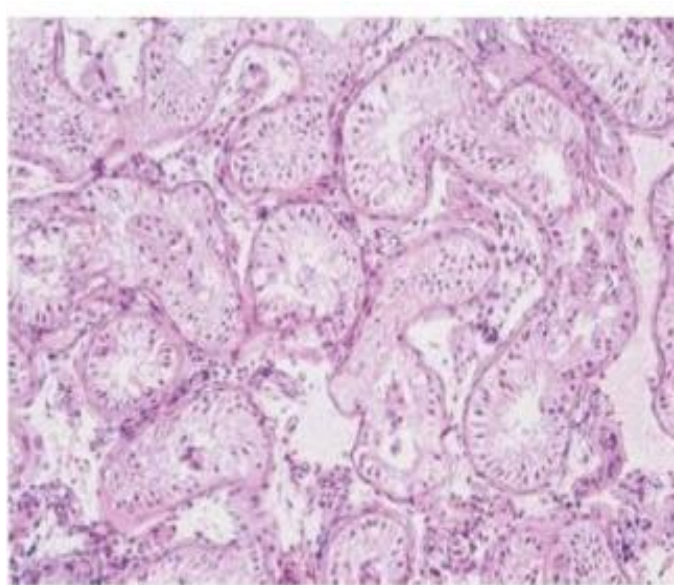


Рисунок 3 – Семенной канатик, содержащий только клетки Сертоли

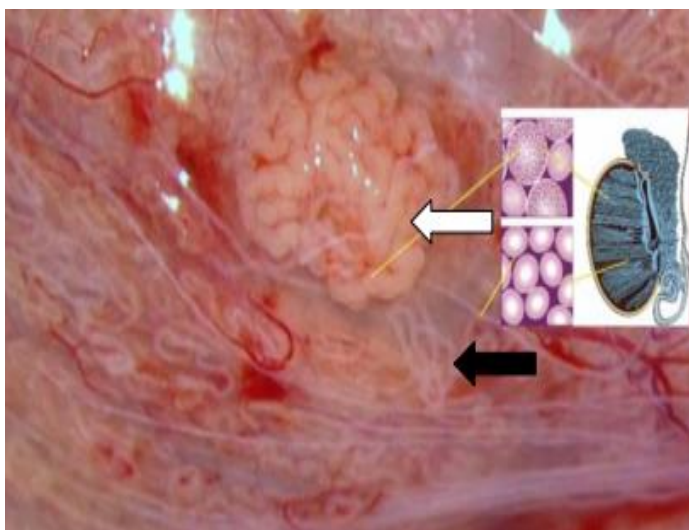
Проводят забор образцов ткани паренхимы яичка, примерно 2-10 мг. Микрохирургическую биопсию завершают, когда сперматозоиды извлечены, или тогда, когда последующее вмешательство может ухудшить кровоснабжение тканей яичка. В дальнейшем из каждого извлеченного материала выделяют небольшие участки семенных канальцев. Образцы ткани рассекают на более мелкие фрагменты, для лучшего извлечения сперматозоидов из семенных канальцев. Затем данную биопсийную ткань суспензируют и несколько раз аспирируют катетером 24G, в последующем подвергают исследованию под фазово-контрастным микроскопом при 200-кратном увеличении. Каждый извлеченный образец ткани исследуют, помещая микрокапли суспензии в камеру для подсчета клеточных элементов, обнаружения и подсчета сперматозоидов. Если нет возможности обнаружения сперматозоидов в биоптате, то извлекают другие образцы ткани из того же яичка, а затем и из противоположного яичка.

## 1.8 Микрохирургическая экстракция сперматозоидов (micro-TESE) у мужчин с НОА

Пациентам с необструктивной азооспермией проводят открытую биопсию яичка (TESE) [171]; аспирационную биопсию яичка (TESA) [172], микродиссекционную TESE (micro-TESE) [173-178].

Возможность обнаружения сперматозоидов чаще всего зависит от используемого метода получения, от навыков оперирующего хирурга, выполняющего биопсию тестикул.

Micro-TESE обладает преимуществами по сравнению с другими видами биопсии яичек, поскольку позволяет находить сперматозоиды в небольших по размеру участках тестикулярной ткани (рисунок 4).



– черной стрелкой указан участок паренхимы с расширенными семенными канальцами, где сперматогенез сохранен; – белой – где он, вероятно, отсутствует

Рисунок 4 – Вид семенных канальцев ткани яичка при micro-TESE

Микродиссекция (micro-TESE) – операция интраоперационного микроскопического обнаружения и извлечения участков функционирующих, то есть расширенных семенных канальцев.

P. Schlegel впервые описал в 1999 г. [179]. Данную методику проводят под эпидуральной, внутривенной анестезией. Применяют оптическое 40-кратное увеличение для точной визуализации кровеносных сосудов, для разрезов в аваскулярных его зонах. При микродиссекции широко рассекают белочную оболочку тестикул вблизи срединной его части. Это дает оптимальную визуализацию паренхимы. С помощью операционного микроскопа при 40-кратном увеличении проводят точную визуализацию паренхимы яичка (рисунок 5). Выделяют непрозрачные белесые и крупные по диаметру семенные канальцы. Micro-TESE прекращают, когда сперматозоиды найдены или, когда дальнейшее оперативное вмешательство приводит к ухудшению кровоснабжения тканей тестикул. В дальнейшем из каждого биоптата вылуцивают небольшие участки семенных канальцев. Кусочки ткани разделяют на более мелкие части, для

облегчения сперматозоидов из семенных канальцев. Ткань биопсии суспензируют и аспирируют катетером Angiocath (24G) и проводят исследование под микроскопом при 200-кратном увеличении. Каждый кусочек извлеченной тестикулярной ткани тщательно исследуют, устанавливая микрокапли суспензии в камеру для определения клеточных элементов и обнаружения сперматозоидов. При не обнаружении сперматозоидов, выделяют другие образцы ткани [180, 181].

К наиболее частым осложнениям, после проведения биопсии яичка относятся фиброз тканей яичка, гидроцеле, острый эпидидимит, интратестикулярная гематома. При использовании УЗИ органов мошонки легко определить изменения после оперативного вмешательства.

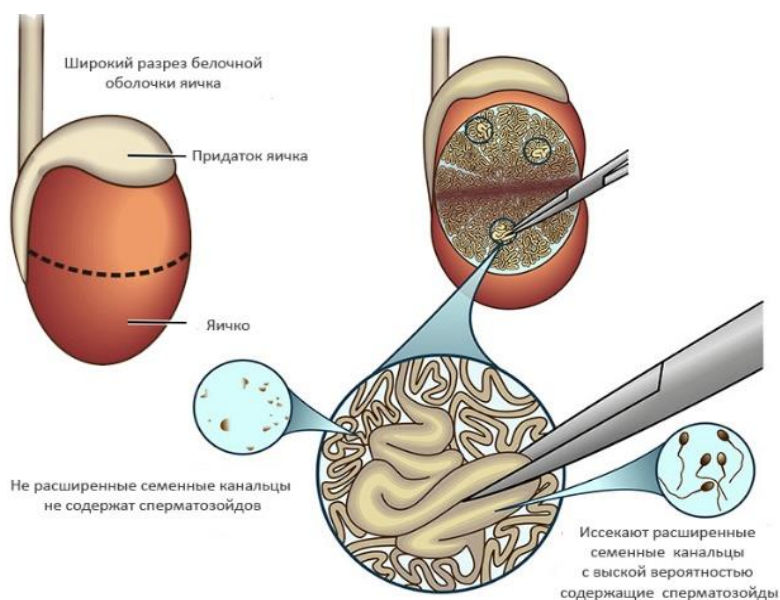


Рисунок 5 – Техника micro-TESE

## 2 ПОНЯТИЕ О СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ. ХАРАКТЕРИСТИКА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК. ПОНЯТИЕ О МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ

### 2.1 Стволовые клетки, виды стволовых клеток и их роль в регенерации

Фриденштейн А.Я. является основателем обучения о мезенхимальных стволовых клетках (МСК), открывший в начале 70-х годов прошлого века количество костномозговых негемопоэтических клеток, формирующих в культуре ткани колониеобразующие единицы фибробластов.

Существуют две гипотезы, которые объясняют действие мезенхимальных стволовых клеток: способность их дифференцироваться в ткани, которые окружают клетку, приводя к восстановлению поврежденного органа или ткани [182-184]; выделение стволовыми клетками цитокинов, факторов роста в окружающую среду [185-187].

МСК выделяют противовоспалительные (адипонектин, интерлейкин-10, простагландин E2) агенты, и подавляют выделение провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли- $\alpha$ , интерлейкин-1, 6, 8, MCP-1) окружающими клетками.

Основными особенностями стволовых клеток являются:

- потенция, то есть умение делиться в разные типы клеток [188];
- самообновление, то есть умение к обширному разрастанию;
- клональность, появляющаяся из одной клетки.

Тотипотентные клетки представляют собой наиболее недифференцированные клетки.

Плюрипотентные стволовые клетки появляются из клеток, делящиеся из трех зародышевых листков – эктодермы, энтодермы и мезодермы, из которых создаются все органы и ткани [189].

Стволовые клетки вырабатываются из 2-х важных источников – эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и взрослые стволовые клетки.

Эмбриональные стволовые клетки относятся к плюрипотентным стволовым клеткам, извлеченные из внутренней клеточной массы - бластоцистов [190].

Стволовые клетки выращиваются *in vitro* для развития разнообразного объема специализированных клеток, включая женские и мужские гаметы, что необходимо для совместного применения в регенеративной медицине.

В последние годы был приобретен важный прогресс в выведении мужских зародышевых клеток из плюрипотентных стволовых клеток [191, 192]. Данные исследования представляют собой экспериментальную модель для выяснения основного молекулярного механизма развития мужских зародышевых клеток и получения гаплоидных зародышевых клеток для лечения мужского бесплодия.

Наиболее часто плюрипотентные стволовые клетки *in vitro* активизируются в сперматогониальные стволовые клетки, затем трансплантируются в стерильные яички мышей [193], в дорсальную область



мышей [194, 195]. На некоторых моделях животных было показано, что сперматогониальные стволовые клетки способны к реколонизации семенника и выявляют правильный сперматогенез [196].

Стволовые клетки из крови или кожи, которые перепрограммированы в клетки эмбрионального типа, включая самообновление и плюрипотентность, известные как «индуцированные плюрипотентные стволовые клетки» [197].

В 2006 г. были выделены из мышечных фибробластов первые индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и видоизменены в плюрипотентные эмбриональные клетки. Данные клетки были затем дифференцированы в эндотелиальные и кроветворные клетки (таблица 2) [198].

Таблица 2 – Типы стволовых клеток и их возможности дифференцировки

Типы стволовых клеток	Источник	Потенциал дифференцировки
Мезенхимальные стволовые клетки	Костный мозг	Мультипотентные
Гемопоэтические стволовые клетки	Костный мозг	Мультипотентные
Стромальные мезенхимальные стволовые клетки	Пуповинная кровь, плацента	Мультипотентные
Фетальные и эмбриональные	Человеческий эмбрион	Плюрипотентные
Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки	Репрограммируемые человеческие соматические клетки	Плюрипотентные

В 1998 г. Thomson et al. выделили и описали эмбриональные стволовые клетки из внутренней массы бластоцистов [199]. Эти клетки собирают из внутренней клеточной массы бластоциста, которая устанавливается к 4-7-му дню развития после оплодотворения. Клетки способны различаться во все типы клеток взрослого организма. Основным источником клеток является абортивный материал или материал, оставшийся после искусственного оплодотворения.

Стволовые клетки, полученные из пуповинной крови, плаценты, пуповины, амниотической жидкости являются плюрипотентными, обладающими потенциалом к высокой пролиферативной активности и дифференцировке, генерирующие потенциал трех зародышевых листков [200].

Незрелые эндотелиальные клетки, которые встречаются в периферических сосудах и костном мозге, участвуют в неоваскуляризации поврежденных тканей во всем теле. Путем подавления активности звездчатых клеток у животных трансплантация эндотелиальных прогениторных клеток замедляла фиброз печени [201] в присутствии повышенного содержания HGF и VEGF.

Эндотелиальные стволовые клетки стимулируют активность матричной металлопротеиназы, пролиферацию гепатоцитов, секрецию факторов роста [202].

Фетальные стволовые клетки формируются из абортивного материала на 9-12 неделе беременности. Эти клетки – смесь унипотентных и мультипотентных стволовых клеток [203].

Мезенхимальные (стромальные) стволовые клетки представляют собой популяцию плюрипотентных клеток, способные дифференцироваться в хондроциты, гепатоциты, остеобласты, адипоциты.

МСК были впервые найдены и охарактеризованы *in vitro*. МСК способны создавать колонии после посадки при относительно низкой плотности. Чаще всего эти клетки продуцируются из костного мозга, который располагается в плоских костях. В костном мозге содержание клеток примерно 0,001-0,01 %.

Одним из свойств мезенхимальных стволовых клеток является высокая адгезивная возможность [204]. Мезенхимальные стволовые клетки регулируют иммунный ответ при разных заболеваниях. Фенотипически МСК выделяют ряд неспецифических маркеров. Возможность МСК к дифференцировке *in vitro* в жир, хрящ, кости является единственным условием для выбора популяций МСК [205].

Всем известно, что мезенхимальные стволовые клетки лишены эндотелиальных и гемопоэтических маркеров, которые включают CD31, CD45. Фенотипически мезенхимальные стволовые клетки идентифицируют по отсутствию маркеров, таких как CD14, CD45, HLA-DR, CD34, CD80, CD86, glycophorin A, по наличию сигнальных молекул: CD90 (Thy1), CD29, CD44, CD129, CD13, CD105, CD166, ICFV-2, CD106, LFA-3 [206-208].

МСК костного мозга BMMSCs получают профиль поверхностных маркеров, таких как CD29, STRO-1, CD90, CD73, CD105, CD146. МСК не экспрессируют маркеры гемопоэтических стволовых клеток, таких как CD34 и CD14 [209]. В последнее время ученые доказывают, что МСК костного мозга вырабатывают различные цитокины [210, 211].

Стволовые клетки человека можно легко культивировать в стандартных условиях; после длительного культивирования *in vitro* клетки теряют свой потенциал пластичности [212]. Мезенхимальные стволовые клетки представляют собой одни из часто встречающихся взрослых мультипотентных стволовых клеток [213].

Они могут быть получены из разных тканей, таких как жировая ткань, периферическая кровь, костный мозг, пуповинная кровь, амниотическая жидкость [214]. Мезенхимальные стволовые клетки характеризуются специфическими поверхностными клеточными маркерами. Данные клетки продемонстрируют различные уровни экспрессии нескольких молекул: стромального антигена 1, CD73 (SH3/4), CD105 (SH2), CD44, CD49, CD166 (молекула адгезии сосудистых клеток), CD54/CD102 (молекула внутриклеточной адгезии), и не экспрессируют поверхностные маркеры, которые характерны для ГСК (CD34, CD14, CD11a/LFA-1, CD45).



Мезенхимальные стволовые клетки способны разделяться в мезодермальные ткани, такие как кости, хрящи, жировая ткань, мышцы [215, 216].

## **2.2 Значение мезенхимальных стволовых клеток**

1. Формирование стромального микроокружения.
2. Строительство гемопоэзинулирующего микроокружения.
3. Поддержание и возмещение пула мезенхимальных стволовых клеток.
4. Деятельность в гомеостатических реакциях организма и в разработке репарации, регенерации, адаптации
5. Участие в морфогенезе.
6. Возможность взаимодействовать с клетками иммунной системы

Мезенхимальные стволовые клетки могут проходить к месту повреждения, фиксироваться, а также осуществлять функцию замещенных клеток. Данные свойства клеток позволяют использовать их для восстановления и возрождения тканей (костей, миокарда, нервной ткани, хрящей, сухожилий) [217-219].

## **2.3 Иммуномодулирующие свойства мезенхимальных стволовых клеток**

Иммунологические свойства этих клеток, такие как противовоспалительные, иммуносупрессивные, иммунорегуляторные способствуют потенциальной роли данных клеток в качестве иммунотолерантных агентов. Parola и Russo описывали мезенхимальные стволовые клетки как фибробластоподобные клетки со способностью к дифференцировке и самообновлению в другие линии мезенхимального типа [231]. С возрастом количество этих клеток и их пролиферативный потенциал, к сожалению, снижаются. Данный тип стволовых клеток интенсивно размножается *in vitro*. Одним из главных преимуществ мезенхимальных стволовых клеток являются иммуномодулирующие свойства.

Мезенхимальные стволовые клетки, которые были выращены *in vitro* обладают способностью регулировать и взаимодействовать функцию многих эффекторных клеток, которые участвуют в процессах приобретенного иммунного ответа [220]. Они проявляют иммуномодулирующие эффекты, блокируют апоптоз активированных и нативных нейтрофилов; подавляют опосредованные комплементом эффекты пролиферации мононуклеарных клеток периферической крови [221, 222], уменьшают количество нейтрофилов, которые связываются с эндотелиальными клетками сосудов [223, 224].

Мезенхимальные стволовые клетки ограничивают миграцию к хемотоксическим факторам, секрецию провоспалительных цитокинов, дегрануляцию тучных клеток [225]. Мезенхимальные стволовые клетки могут блокировать дифференцировку CD34+клеток, которые выделены из моноцитов крови или костного мозга в зрелые дендритные клетки как с помощью секретлируемых паракринных факторов, так и при прямом контакте [226, 227]. Мезенхимальные стволовые клетки подавляют трансформацию незрелых

дендритных клеток в зрелые формы, а также ограничивают мобилизацию дендритных клеток в ткани [228]. Под влиянием этих клеток провоспалительные макрофаги M1 трансформируются в клетки типа M2 с противовоспалительным фенотипом, а секретируемый ими интерлейкин подавляет пролиферацию T-клеток [229, 230]. Мезенхимальные стволовые клетки снижают уровень провоспалительных цитокинов, которые синтезируются T-лимфоцитами, таких как интерферон  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) и фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [231].

#### **2.4 Паракринные свойства мезенхимальных стволовых клеток**

Мезенхимальные стволовые клетки секретируют спектр паракринных факторов, называемые секретомом, поддерживающие регенеративные процессы в поврежденных клетках и тканях. Они включают белки, компоненты внеклеточного матрикса, которые участвуют в процессе адгезии. Мезенхимальные стволовые клетки секретируют факторы, которые способствуют ангиогенезу, например, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [232-234].

К свойствам мезенхимальных стволовых клеток относят: высокий пролиферационный потенциал, возможность к асимметричному и симметричному делению, фибробластоподобная морфология, легко индуцируемая дифференцировка, высокий потенциал к адгезии, образование колоний в культуре.

На данный день определены следующие маркеры, которые экспрессируются мезенхимальными стволовыми клетками: STRO-1, Thy-1, SH-2, SH-3, SH-4, Sca-1, CD29, CD44, CD71, CD106, CD124, CD120a. Маркеры CD45 и CD34 не экспрессируются, что дает отличие МСК от гематопозитических клеток. МСК организуют достаточно активную систему в костном мозге, которая состоит из эндотелия, фибробластов, компонентов экстрацеллюлярного матрикса, ретикулярных клеток, а также цитокинов. Согласование с другими клетками и между собой осуществляется через молекулы адгезии и специфические рецепторы (Cheng et al., 2000; Reese et al., 1999; Klein, 1995).

#### **2.5 Свойства и функции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга**

К общим способностям МСК относятся: способность к асимметричному и симметричному делению; высокий пролиферативный потенциал; высокая возможность к адгезии; создание колоний в культуре; фибробластоподобная морфология. Мезенхимальные стволовые клетки способны дифференцироваться в клетки костной (остеобласты), жировой (адиноциты), хрящевой (хондроциты) [235], нервной тканей [236] и мышечной тканей [237].

Выбор источника для забора мезенхимальных стволовых клеток должен осуществляться индивидуально, учитывая каждого конкретного пациента.

Золотым стандартом клеточной терапии является аутологичная трансплантация.

Костный мозг преимущественно получают путем аспирации его из подвздошной кости. К сожалению, на сегодняшний день не существует единого протокола выращивания *in vitro* мезенхимальных стволовых клеток, каждая отдельно взятая лаборатория предлагает свои возможности и варианты субстрата антибиотика, состава ростовой среды.

Мезенхимальные стволовые клетки являются плюрипотентными стволовыми клетками взрослого организма, лечебный эффект которых построен на возможности предоставлять множество сигнальных молекул, воспроизводящих функциональную активность различных клеток организма [238]. Мезенхимальные стволовые клетки являются стромальными клетками, которые пользуются способностью к самообновлению. МСК являются предшественниками ряда тканей человека, имеют значительный выбор возможного использования в регенеративной медицине. Данные клетки могут быть выделены из разных источников, таких как жировая ткань, костный мозг, плацента, пульпа молочного зуба, печень, эндометрий [239].

## **2.6 Среда, применяемые для культивации МСК**

В качестве среды для выделения мезенхимальных стволовых клеток была использована DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). Данная среда содержит в составе витамины, неорганические соли, аминокислоты, D-Глюкозу, пируват натрия, феноловый красный. Использовались стрептомицин сульфат, пенициллин G (натриевая соль), амфотерицин B, которые были растворены в 0,85 % солевом растворе. DMEM хранится при температуре 4°C. Перед использованием в данную среду добавляют 10 мл фетальной сыворотки (FBS) во флаконы до получения 10 % раствора сыворотки. Перед применением среду прогревают до температуры 37°C.

Биоптат губчатого костного мозга смешивают с DMEM и обрабатывают до образования взвеси, затем центрифугируют для отделения костного мозга от кусочков костей. Клетки костного мозга, которые состоят из мезенхимальных стволовых клеток; а также белых и красных клеток крови, разделяют путем пропускания взвеси, которая содержит клетки костного мозга через шприцы с иглами размером 16G, 18G, 20G. Далее мезенхимальные стволовые клетки костного мозга культивируются и прилипают к поверхности пластика в чашках Петри в течение от 1 до 7 дней. Следующие замены среды осуществляются каждые 4 дня, пока клетки не сливаются. В результате на выходе наблюдается 4-кратное повышение количества недифференцированных МСК. Изъятие клеток с культуральных чашек производится с использованием освобождающего вещества - ЭДТА (этилендиамин тетрауксусная кислота) или 0,25% трипсина однократно. Клеточную суспензию отсеивают через капроновый фильтр, центрифугируют со скоростью 1500 об/мин в течение 10 мин. Клетки в количестве  $8 \times 10^4$  кл/мл высевают на адгезионные пластиковые чашки Петри. Выращивание осуществляется при 37° С в CO<sub>2</sub> инкубаторе во влажной среде и при постоянном давлении 5 % CO<sub>2</sub>. Полная смена ростовой среды осуществляется один раз в 72 ч. При хорошем качестве культуры и в норме

клетки имеют типичную морфологию и четко различимые границы, они расположены в виде колонии клеток округлой формы. Для оценки количества жизнеспособных мезенхимальных стволовых клеток на выходе используют тест на исключение красителя, подсчет производится в камере Горяева. Контроль стерильности клеточной культуры на грибы, бактерии проводится с помощью микробиологических питательных сред в асептических условиях. Суспензия клеток считается стерильной при отсутствии роста во всех засеянных пробирках. Готовая суспензия клеток разливается в стерильные флаконы, с указанием данных больных, названия и характеристики клеток, то есть количества, даты забора, культивации и трансплантации. Транспортировка клеточной биомассы осуществляется в специальном контейнере с температурой 25-37°C.

Количество полученных клеток, напрямую зависит от возраста пациента, наличия у различных травм и соматических заболеваний [240].

Поскольку МСК не выделяют определенные маркеры, то выделение клеток основано на возможности прилипать к пластику. Впервые данное свойство стволовых клеток было описано А.Я. Фриденштейном. В этом исследовании описывалось, что костный мозг выращивался на пластике. Через 4 часа неприлипшие стволовые клетки очищались. Было отмечено, что прилипшие стволовые клетки были в течение 2-4 дней в состоянии покоя, в последующем происходила быстрая пролиферация. Методика данного протокола используется по настоящее время. Полученный объем костного мозга центрифугируют по вектору плотности. В связи с чем используются растворы с низкой вязкостью, высокой плотностью (1,077 г/мл), низким осмотическим давлением (Ficoll, Percoll). Это способствует отбору моноклеарной фракции костного мозга, которая содержит МСК [241]. Для культивирования мезенхимальных стволовых клеток часто употребляется среда Eagle, преобразованная Dulbecco (DMEM). DMEM – LG с пониженным содержанием глюкозы (1,000 мг/мл) (Romanov et al. 2003). К требованиям культивирования относятся: инкубация клеток с температурой 37°C, влажная среда с содержанием 95 % кислорода и добавлением 5 % углекислого газа. Питательные среды меняют каждые 2-3 дня. Когда стволовые клетки доходят до монослоя, они дезинфицируются трипсином, отмываются и собираются в новые флаконы. Среды, используемые в настоящее время для культивирования МСК, содержат инактивированную эмбриональную телячью или бычью сыворотки (FCS или FBS).

Использование аутологичной сыворотки с наименьшей концентрации (1, 3%) не разрешает достичь благоприятных результатов при культивировании, но при применении высоких концентраций сыворотки следует учитывать о необходимости использования большого количества крови [242]. При употреблении бессывороточной среды (UC) с добавлением 2 % заменителя сыворотки ULTROSER (содержащий все факторы необходимые для роста клеток – витамины, факторы роста, гормоны, белки), ученые выявили положительные результаты при культивировании и пролиферации МСК в сравнении со средой aMEM с 15 % телячьей сывороткой. Употребление данной среды позволяет мезенхимальным стволовым клеткам сохранять мультилинейный потенциал и

гемопоез, а наличие антиоксидантов улучшает жизнеспособность стволовых клеток [243]. Ученые доказали, что мезенхимальные стволовые клетки, культивированные в среде с плазмой с добавлением тромбоцитов, имели похожие иммунологические, морфологические характеристики и потенциал дифференцировки, также как и мезенхимальные стволовые клетки, выращенные с добавлением эмбриональной телячьей сывороткой (FCS).

## **2.7 Маркеры мезенхимальных стволовых клеток**

МСК представляют собой мультипотентные клетки-предшественники мезодермы, которые обладают возможностью дифференцироваться в костную, хрящевую, жировую, мышечную ткани, обеспечивая тем самым широкий спектр терапевтических возможностей. Клетки экспрессируют различные поверхностные маркеры, включая CD13, CD9, CD10, CD54, CD44, CD105, CD55, CD90, CD166 и отрицательные CD14, CD45, CD34, CD133.

Взрослые клетки можно выделить из стромы костного мозга. Эти клетки экспрессируют панель ведущих маркеров, включающие CD10, CD105, CD13, CD271, CD73 [244].

МСК, полученные из костного мозга, представляют собой постнатальные стволовые клетки, которые способны к дифференцировке и самообновлению в адипоциты, хондроциты, остеобласты, нервные клетки. В исследовании сообщается, что данные клетки экспрессируют ключевые факторы: CD29, CD146, STRO-1, CD90, CD73, CD105, SSEA4 [245].

Антигены CD – это антигенные маркеры или белки, регулируют передачу сигналов клеток, генерируют каскад сигналов.

Антиген CD34 экспрессируется на стволовых клетках лимфоидного происхождения.

Антиген CD3 – маркер Т-лимфоцитов, экспрессируется на 70 % циркулирующих лимфоцитов на всех стадиях дифференцировки, необходим для их активации. CD3 экспрессируется вначале в цитоплазме протимоцитов, стволовых клеток, из которых затем появляются Т-клетки в тимусе. Эти протимоциты дифференцируются в общие тимоциты, затем в медуллярные тимоциты и здесь маркер CD3 начинает мигрировать в клеточную мембрану.

Антиген CD4 – мембранный антиген зрелых Th2 и Th1-хелперов, рецептор для молекулы МНС-II. Этот антиген связывается с антигенами МНС-II. CD4 проводит в клетку сигналы супрессии и апоптоза.

Антиген CD4+FOXP3+ - Т-регуляторы происходят из одной линии с антигеном CD4 и экспрессируют FOXP3, CD4, CD25.

Антиген CD16 – рецептор Fc-фрагмента IgG, молекула иммуноглобулинов на Т-, В-лимфоцитах, макрофагах, моноцитах, нейтрофилах. Разновидности CD16 рецепторов: CD16a и CD16b, участвующие в передаче сигнала, участвующие в запуске лизиса НК-клетками. CD16-моноциты проявляют цитотоксичные свойства в отношении инфицированных и опухолевых клеток в присутствии IgG. Антиген CD16 - маркер созревания нейтрофилов.

Антиген CD20 – поверхностный антиген всех В-клеток, которые начинаются с про-В-фазы (CD117+, CD45R+), основная функция – обеспечение оптимального иммунного ответа В-клеток против Т-независимых антигенов. Действует как кальциевый канал в клеточной мембране.

Антиген CD45 – лейкоцитарный антиген сигнального семейства протеин-тирозин-фосфатазы, экспрессирующийся на мембранах клеток гемопоэза, регулирующий гемопоэз: дифференцировку, митотический цикл, рост, онкогенез. CD45 в Т-клетках связан с внутриклеточными и мембранными молекулами, образует комплексы CD4/CD8 и TCR-CD3, участвует в передаче сигнала в клетку.

Антиген CD73 – поверхностный фермент, который можно обнаружить во многих тканях, например, как в сосудистом эндотелиоците. CD73 считается ко-сигнальной молекулой на Т-лимфоцитах и молекулой адгезии для активации лимфоцитов, связывания лимфоцитов к эндотелию; контролирование транспорта ионов и эпителиальной жидкости.

Антиген CD105 – мембранный гликопротеин 1 типа, часть комплекса  $\beta$ -рецепторов TGF, участвует в передаче его сигналов. Нужен для формирования цитоскелета, динамики очаговой адгезии, эндоцитарного везикулярного транспорта, клеточной морфологии, ангиогенеза, миграции, пролиферации, образования кластеров. Экспрессируется также у небольшого семейства примитивных CD34+ гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток. Эритропоэтин, интерлейкин-15 и фактор роста эндотелия сосудов поддерживают гемопоэтический потенциал клеток CD34+/CD105+. Эндогенный TGF- $\beta$ 1-критический фактор поддержания незрелости CD34+/CD105+.

Антиген CD117+ – рецепторная белковая тирозинкиназа связывается с фактором роста стволовых клеток, цитокиновый рецептор на поверхности гематопоэтических стволовых клеток. Этот антиген важный поверхностный маркер типирования прогениторов гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге.

В данной таблице 3 приведены поверхностные маркеры мезенхимальных стволовых клеток.

Таблица 3 – Поверхностные маркеры мезенхимальных стволовых клеток

Тип клетки в исследовании	Характер клеточной поверхности
Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки	Они должны экспрессировать CD105, CD73 и CD90 и не иметь экспрессии CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79альфа или CD19 и поверхностные молекулы HLA-DR
Мезенхимальные стволовые клетки	Клетки были отрицательными по гемопоэтическим маркерам (CD14, CD34, CD45), но положительными по маркерам, присутствующим в мезенхимальных клетках CD13, CD29, CD90
Мезенхимальные стволовые клетки	Обнаружена популяция CD34 и CD45-негативных клеток, которые были положительными на CD44, CD73 и CD105

Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки	Положительный на SH2, SH3, SH4, CD29, CD44 и HLA-ABC (MHC класс I), низкий положительный на CD90 и CD105, но отрицательный на CD10, CD11b, CD14, CD34, CD117, HLA-DR, DP, DQ (MHC класс II) и EMA
Мезенхимальные стволовые клетки	Клетки экспрессировали CD29, CD44, CD71, CD90 и CD105/SH2 и SH3, выраженный STRO-1. Нет экспрессии CD31, CD34 и CD45. Положительная экспрессия CD13 и отсутствие CD14, CD16, CD56, CD61, CD62(e), CD104 и CD106
Полученный из костного мозга человека мезенхимальные стволовые клетки	CD29, CD44, CD90 и CD90
Мезенхимальные стволовые клетки	STRO-1 положительный, CD105, CD90 и CD73, Экспрессия CD105, CD166 и CD44 и отсутствие CD45, CD34 и CD14 на поверхности мезенхимальных стволовых клеток, подобных клеткам
Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга	CD13, CD15, CD73, CD140b, CD144, CD146 и CD164
Мезенхимальные стволовые клетки	CD49d (-), CD106 (+), CD34 (-)
Примечание – Составлено по источникам [246-254]	

## 2.8 Проточная цитометрия

Проточная цитометрия это метод исследования дисперсионных субстанций в режиме поштучного анализа частиц, которые относятся к составу дисперсной фазы по сигналам, собираемым в ходе рассеивания света и флуоресценции. Результаты исследования могут быть получены в течение нескольких часов.

Проточная цитометрия является информативным методом количественного определения и идентификации поверхностных маркеров стволовых клеток. На западе данный метод используется для обозначения иммунофенотипического профиля, определяющего эффективность клеточного продукта [255, 256]. С помощью проточной цитометрии можно определить жизнеспособность, качество определенной популяции [257]. Оценка точности осуществляется с определением иммунофенотипа, совпадение которого должна быть более 80 %. При проведении проточной цитометрии образцы стволовых клеток подвергают окрашиванию флуоресцирующими моноклональными антителами и в последующем при помощи лазера испытывают анализ как однородную клеточную суспензию.

Вначале определяют размер, неоднородность за счет прямого и бокового светорассеяния, измеряют флуоресценцию. Исследование жизнеспособности стволовых клеток проводится с использованием 7-AADD (7-амино-актиномицин). Проточно-цитометрический анализ определяет численность клеток костного мозга, периферической крови больных, лимфоидной ткани, проводит изучение типов лейкоцитов за счет маркировки клеток антителами, сопряженными с флуорохромом.

#### Преимущества:

- высокая скорость проведения анализов;
- определение фенотипа и маркеров;
- способность сортировки маркеров;
- способность измерения сразу же двух и более параметров для стволовых клеток;

#### Недостатки:

- использование суспензии из разных клеток для определения анализа;
- высокая стоимость реагентов.

Согласно международному обществу по клеточной терапии были названы критерии идентификации МСК: возможность к дифференцировке в хондроциты, остеобласты, адипоциты в условиях *in vitro*; адгезия к пластику при соблюдении условий при выращивании; окрашивание по положительным антигенам CD73, CD90, CD105 (таблица 4) и отрицательное по CD11b, CD34, CD45 [258].

Таблица 4 – Маркеры стволовых клеток

Название	Расположение
CD90 (Thy-1)	– мезенхимальные, гематопозитические СК
CD44	– мезенхимальные, эмбриональные, гематопозитические
CD105(эндоглин)	– мезенхимальные, гладкомышечные СК, фибробласты
CD73 (NT5E)	– лимфоциты, СК всех типов, лимфобласты
Примечание – Составлено по источнику [259]	

Засорение культур мезенхимальных стволовых клеток фибробластами приводит к понижению потенциала дифференцировки стволовых клеток [260]. Результаты научных исследований доказывают, что использование ITGA11, CD26, CD10, CD146, CD106 необходимо для определения МСК костного мозга [261]. Данные поверхностные маркеры используются для определения качества культур МСК после криоконсервации, культивирования. Хондрогенное распределение МСК применима у стволовых клеток, положительных по CD90 и отрицательных по CD45 [262]. МСК, находящиеся в разных тканях, имеют общие черты [263]. МСК костного мозга не получают маркер CD34, а МСК жировой ткани экспрессируют маркер CD34 [264]. CD271 выделяется в синовиальной жидкости [265], (таблица 5).

Таблица 5 – Иммунофенотип МСК в зависимости от источника выделения

Источник МСК	(+) маркеры	(-) маркеры
Костный мозг	CD44, CD73, CD90, CD105	CD34, CD45, CD117
Жировая ткань	CD13, CD29, CD44, CD54, CD55, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, HLA I	CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD80, CD117, CD133, CD144
Пуповинная кровь	CD13, CD51, CD73 (SH3), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2), CD146, CD166 (ALCAM)	CD14, CD31, CD33, CD34, CD45, CD38, CD56



Эндометрий	CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105	CD34, HLA-DR
Примечание – Составлено по источнику [266-269]		

Благодаря данному методу определена высокая экспрессия CD44 в стволовых клетках волосяного фолликула; сперматогониальных стволовых клетках (SSC), гранулезных клетках. Высокая экспрессия CD90 в сперматогониальных стволовых клетках и гранулезных клетках может связываться с высоким потенциалом дифференцировки данных клеток [270].

Для идентификации линии МСК из костного мозга используются следующие положительные поверхностные маркеры: CD90+, CD44+, CD29+, CD166+, CD73+, CD105+; и негативные: CD45–, CD19–, CD14–, CD34–. А для идентификации МСК жировой ткани используются следующие поверхностные маркеры: CD90+, CD44+, CD29+, CD73+, CD105+, CD166+ и отрицательные: CD34–, CD45–, CD14–, CD31– [271].

## **2.9 Трансплантация стволовых клеток и мужское бесплодие: современное состояние и перспективы развития**

Стволовые клетки определяются как клетки со способностью дифференцироваться в другие типы клеток, способностью к самообновлению. Тотипотентные клетки могут дифференцироваться во все типы клеток [272]. Мультипотентные стволовые клетки могут разделяться в несколько типов клеток в пределах одного зародышевого слоя, а унипотентные стволовые клетки могут дифференцироваться только в один тип клеток [273].

Регенеративная медицина является одним из динамически развивающихся направлений в медицине. Большое внимание привлекают способности клеточных технологий в регенеративной медицине всех врачей разных специальностей.

Мезенхимальные стволовые клетки обладают иммуносупрессивными свойствами, способны ингибировать активацию, оказывать антипролиферативные эффекты на лимфоциты. Мезенхимальные стволовые клетки усиливают секрецию IL-4, понижают секрецию IFN $\gamma$ . Мезенхимальные стволовые клетки продуцируют ростовые факторы и цитокины, необходимые для дифференцировки и пролиферации кроветворных предшественников.

Нахождение в костном мозге стволовых клеток стромы, помимо кроветворных клеток, образуют в колонии фибробластоподобные клетки, описанные ученым Фриденштейном. Эти клетки являются колониеобразующими предшественниками фибробластов (КОЕ-ф), имеющие возможность к дифференцировке и обновлению в мезенхимальные клеточные линии.

Большую перспективу по всему миру приобретает использование достижений клеточной терапии. Клеточная терапия, а именно использование стволовых клеток, предлагает новейший подход в лечении разных заболеваний [274].

Трансплантация МСК проводится в стерильных условиях. Количество мезенхимальных стволовых клеток зависит в первую очередь от

индивидуальных особенностей организма пациента, от биологического резерва клеток костного мозга, зависящая от длительности заболевания, возраста пациента. С позиции применения для клеточной терапии, наиболее перспективными считаются мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека. Данные клетки создают последовательную систему в костном мозге, состоящую из ретикулярных клеток, эндотелия, цитокинов, фибробластов, компонентов экстрацеллюлярного матрикса [275].

Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток несложное. Мезенхимальные стволовые клетки получают из донорского, аутологичного или фетального материала. Эти клетки хранят путем криоконсервации. Аутологичные клетки имеют преимущества в виде фракции высокоочищенных собственных стволовых клеток. Выращенные в культуральной среде аутологичные МСК при введении пациенту безопасны, так как являются собственными клетками, благодаря чему исключается возможность аллергических реакций и осложнений.

## **2.10 Показатели сперматогенеза после трансплантации МСК на животных-хомяках, индуцированных бусульфаном**

Регенеративная терапия необструктивной азооспермии с применением стволовых клеток не так давно стала рассматриваться [276] как важный метод лечения мужского бесплодия [277].

Стволовые клетки известны как недифференцированные клетки, имеющие способность производить клетки, подобные себе, и возможность делиться в разные специфические соматические клетки. Мезенхимальные стволовые клетки имеют одинаковые свойства, которые охватывают самообновление, положительную пролиферативную возможность, а также способность к дифференцировке.

Исследования *in vitro* доказали, что разные виды стволовых клеток, включая мезенхимальные стволовые клетки, можно разграничивать в направлении женских зародышевых клеток [278]. Возможности получения мужских половых клеток *in vitro* из плюрипотентных клеток были весьма успешны [279]. Эмбриональные стволовые клетки *in vitro* дифференцируются в клетки Сертоли и первичные половые клетки [280].

Использование мезенхимальных стволовых клеток для клеточной терапии необструктивной азооспермии возможно в будущем будет являться выбором в лечении.

Научно доказано, что мезенхимальные стволовые клетки *in vitro* владеют способностью дифференцировки в мужские половые клетки. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (BM-MSC) впервые используются для создания мужских половых клеток как *in vitro*, так и *in vivo* [281]. Клетки с повышенной способностью деления, такие как клетки сперматогенеза, чувствительны к бусульфану, который является химиотерапевтическим агентом, используемый для лечения хронического миелолейкоза [282]. Подтверждено, что разрастание сперматогониальных стволовых клеток животных, например,

хомяка, возможно нарушено бусульфаном, а индукционный метод необструктивной азооспермии описан у животных [283]. Эфферентные протоки у хомяков выходят непосредственно из вершины [284], у крыс и мышей выходят из яичка эксцентрично, поэтому доступ к эфферентным протокам для внутритубных инъекций клеток облегчается. В связи с этим хомяк выбран для дальнейших исследований.

В экспериментальном исследовании были отобраны две самки и двенадцать самцов хомяков-альбиносов, находившиеся в Центре сравнительной и экспериментальной медицины Медицинского университета Шираз в течение 12 часов цикла свет/темнота. Этот проект был выполнен в соответствии с инструкцией по уходу за животными Этического комитета Университета Шираз, и проект был рассмотрен и одобрен Комитетом вице-канцлера исследований (Школа ветеринарной медицины).

Чтобы выделить AT-MSCs, 2-х самок и самцов-хомяков анестезировали ингаляцией эфиров, а затем подчиняли эвтаназии путем вывиха шейки матки. В последующем, после бритья кожи живота проводили дезинфекцию 70 % спиртом, производили разрез на коже; жировые ткани брюшной полости полностью удаляли. Образцы самок и самцов помещали в одной пробирке, которая содержала физиологический раствор (PBS, Gibco) с добавлением стрептомицина и 1 % пенициллина (Sigma). Жировые ткани промывали раствором PBS, чтобы убрать клетки крови. В последующем образцы подготавливали на маленькие кусочки, около 1 мм, инкубировали при 37°C в коллагеназе типа II (Gibco) на водяной бане и встряхивали в течение 30 минут. Терапия AT-MSC может вызывать регенерацию измененных зародышевых слоев в семенных канальцах хомяков. Полученные данные могут повысить вероятность использования мезенхимальных стволовых клеток.

### 3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1 Информация об участниках исследования и наборе данных

Для участия в исследовании были обследованы 19 мужчин, которые начали лечение в АО ННМЦ в 2019 году в виде одной процедуры аутотрансплантации мезенхимальных стволовых клеток, после подписания информированного согласия (Приложение Б).

На момент начала исследования (2019, сентябрь) все 19 мужчин потратили много лет на симптоматическое лечение у андрологов, без положительных результатов, в связи с чем были отобраны для лечения стволовыми клетками.

*Критерии включения:*

Пациенты с подтвержденным диагнозом необструктивной азооспермии на основании двух отрицательных спермограмм с центрифугированием (3 месяца между ними).

Пациенты ранее не применявшие хирургические методы извлечения сперматозоидов (биопсия яичка)

*Критерии исключения:*

- анатомические аномалии полового тракта;
- пациенты с варикоцеле 2 или 3 степени;
- новообразования в анамнезе и в данный момент;
- обструктивная азооспермия;
- использование химиотерапии, тестостерона или антиандрогенов за последние два года;
- пациенту не ясна цель исследования или отказ от лечения и выполнения инструкции после лечения;
- пациенты с историей психического расстройства;
- участие в другом испытании, которое будет препятствовать данному испытанию.

Характеристика больных на начало исследования указана в таблицах 6, 7, рисунок 6, таблица 8, рисунок 7, таблица 9, рисунки 8, 9, 10.

Статистическая обработка данных производилась с помощью программного обеспечения R и Excel (Microsoft Office 2016).

Таблица 6 – Исходные данные пациентов до начала терапии

Параметры	Среднее	Медиана	1;3 квартиль	Мин.; макс. значение
Возраст, лет	33.3	32	29; 37	24; 48
Тестостерон, нг/мл	6.82	4.88	2.78; 2.21	0; 23.80
ФСГ, мМЕ/мл	28.62	21.72	18.86; 29.80	13.55; 68.50
ЛГ, мМЕ/мл	10.37	8.56	6.54; 11.22	1.17; 38.70
Пролактин, нг/мл	8.45	8.80	6.86; 9.19	5.30; 12.80
Ингибин В, пг/мл	7.22	5.40	4.05; 9.31	2.10; 17.90
Спермограмма, млн./мл	0	0	0; 0	0; 0

Таблица 7 – Показатели ЛГ до и после лечения

Параметры	Нормальные показатели	Повышенные показатели
До лечения	10	9
После лечения	15	4

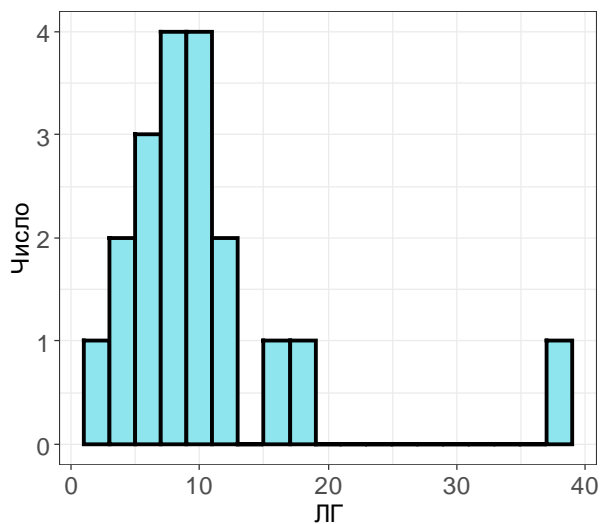


Рисунок 6 – Гистограмма распределения ЛГ в выборке пациентов

Таблица 8 – Показатели ФСГ до и после лечения

Параметры	Уровень нормализовался	Высокий показатель
До лечения	0	19
После лечения	3	16

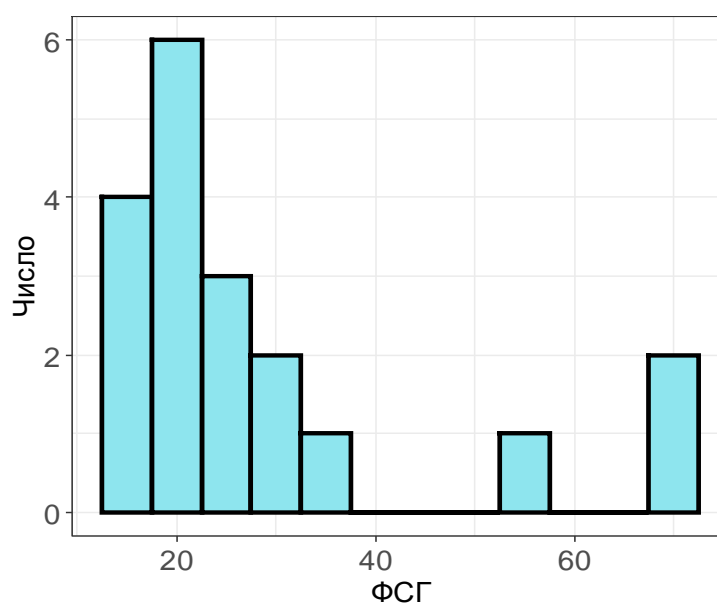


Рисунок 7 – Гистограмма распределения ФСГ в выборке пациентов

Таблица 9 – Показатели тестостерона до и после лечения

Тестостерон	Норма	Понижен	Повышен
До лечения	6	6	7
После лечения	12	7	0

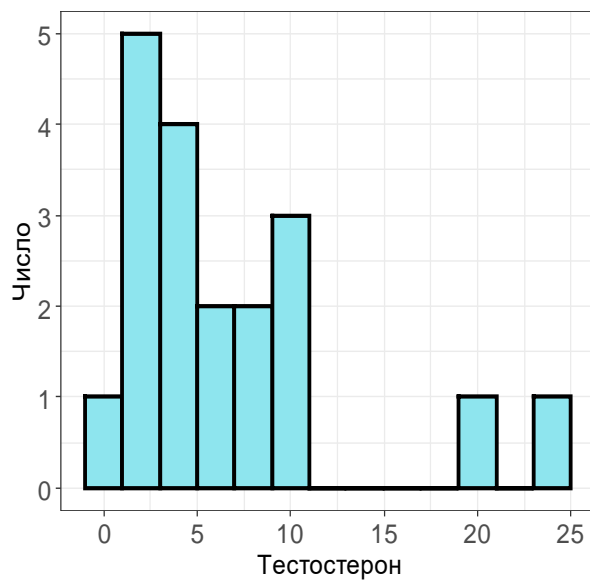


Рисунок 8 – Гистограмма распределения тестостерона в выборке пациентов

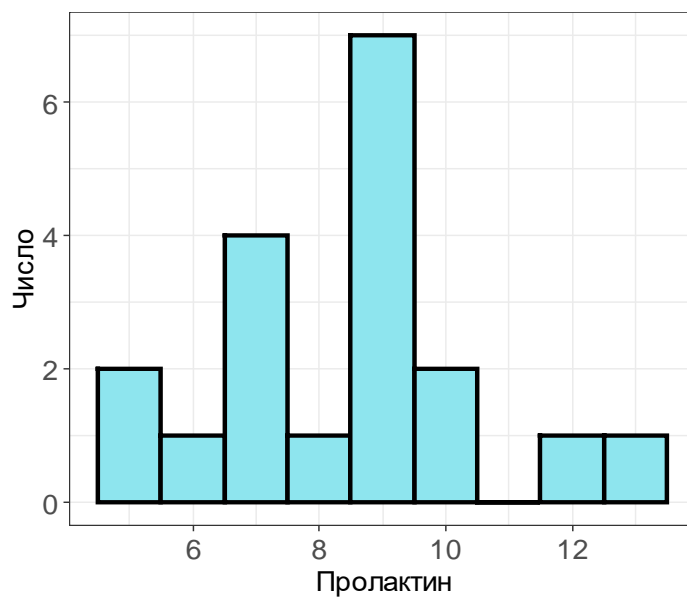


Рисунок 9 – Гистограмма распределения пролактина в выборке пациентов

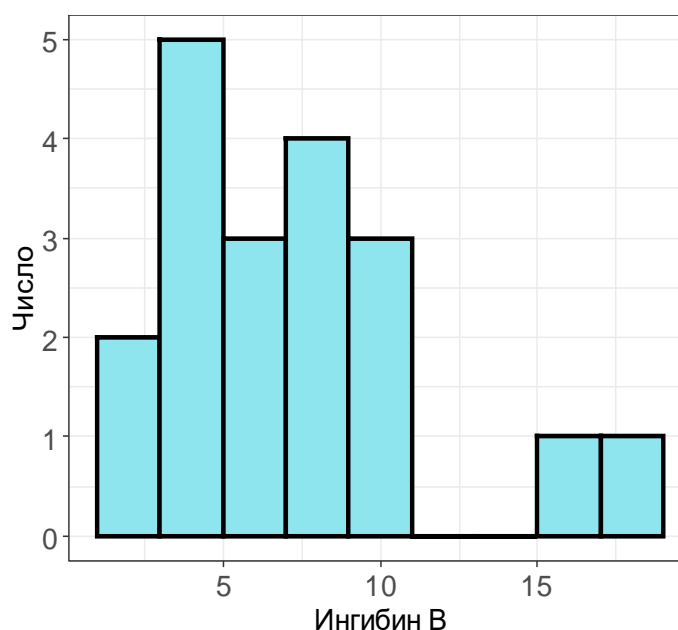


Рисунок 10 – Гистограмма распределения ингибина В в выборке пациентов

Было обследовано 19 пациентов, обратившихся первично в клинику АО «ЭКОМЕД плюс», в период с 2019 по 2022 года по поводу необструктивной азооспермии, и ранее прошедшие лечение у андрологов, и обследованные у заведующего отделением клеточных технологий АО «ННМЦ».

Цель, задачи, а также методика исследования были подробно объяснены каждому пациенту. Перед процедурой каждому больному на доступном и понятном ему языке предоставлялась подробная информация о предстоящих вмешательствах: суть метода исследования, технология выполнения, возможные риски, болевые ощущения, побочные эффекты, а также осложнения.

Все пациенты получили исчерпывающую информацию об исследовании и принятии решения об участии в нем, и подписали добровольное информированное согласие с соблюдением всех требований протокола №8 от 09.06.20, одобренного Локальной этической комиссией НАО «Медицинского университета Астана».

### 3.2 Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток аутологичного костного мозга

Процедура трансплантации мезенхимальных стволовых клеток костного мозга выполнялась 1 раз на протяжении всего лечения. Схематичное изображение выполнения МСК приведено на рисунке 11.



а – миелоэкзфузия; б – изоляция МСК, культивация

### Рисунок 11 – Схема процедуры извлечения МСК

#### 3.2.1 Этап 1 – миелоэкзфузия

Забор костного мозга (СТ ННМЦ ИСМ МИ - 10.04.67.02), относится к процедурам высокого риска; выполняется в стерильных условиях операционного блока со строгим соблюдением всех правил асептики и антисептики после ознакомления пациентом информированного согласия (Приложение В).

Извлечение костного мозга осуществляется путем чрескожной аспирации из передневерхней ости гребня подвздошной кости на стороне, подходящей для хирурга. При положении больного на спине точка для пункции находится на 3 см кзади от передневерхней ости гребня подвздошной кости (рисунок 12).

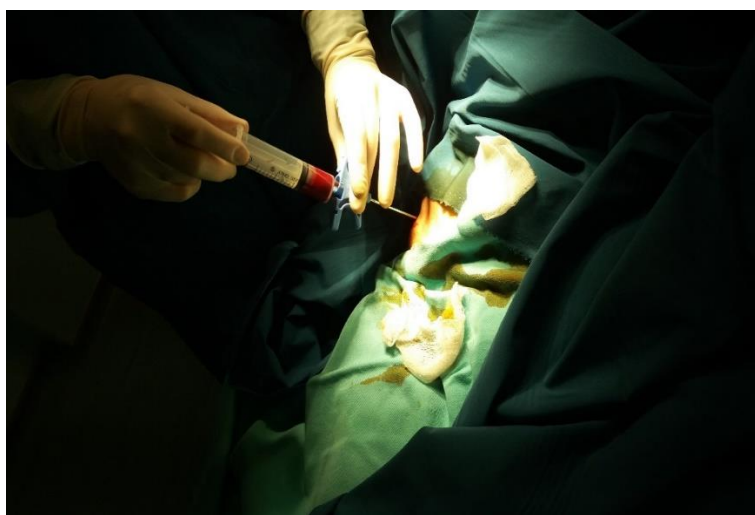


Рисунок 12 – Место выполнения миелоаспирации

Место забора костного мозга обрабатывается трехкратно 1% йод-содержащим раствором повидона-йода от центра к периферии по методу Филончикова-Гроссиха и обкладывается стерильным бельем. Местное обезболивание кожного покрова производится путем внутрикожного введения в количестве 10-20 мл 0,5 % раствора новокаина по типу «лимонной корки», вкол иглы производится над передне-верхней остью, игла направляется вдоль гребня, и затем проводится над его поверхностью под углом 45° к коже. Далее производится местная анестезия надкостницы в 2-3 точках предполагаемого участка аспирации: игла при этом держится строго вертикально, проводится до упора в кость, введение анестетика (2% раствора лидокаина – 6 мл) производится под давлением. После наступления анестезии (2 минуты) участок кости в точке пункции фиксируется, и пункционная игла вводится посередине выбранного участка строго перпендикулярно к поверхности кожи. Вращательно-поступательными движениями иглы производят прокол кожи и фасции, игла продвигается вглубь до упора в кость. Данные движения продолжают до погружения всех боковых отверстий иглы до коркового слоя кости. Достижение



губчатого вещества сопровождается часто снижением сопротивления или ощущением провала, а прохождение компактного вещества коркового слоя кости требует чаще всего многих усилий (рисунок 13).

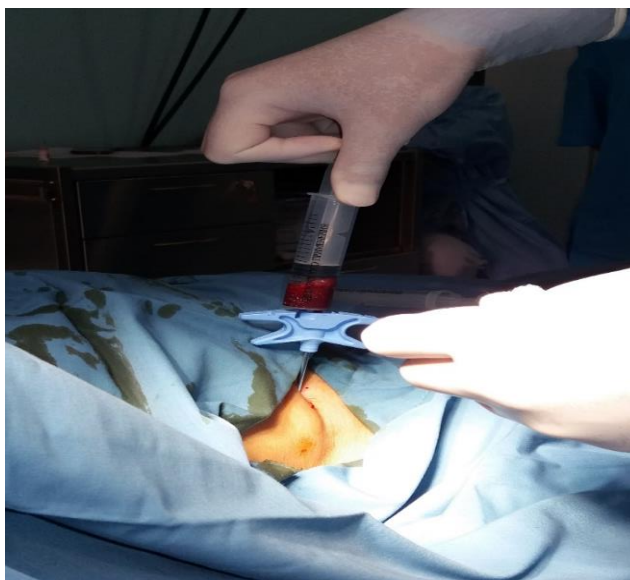


Рисунок 13 – Аспирация костного мозга

После тяжелой установки иглы внутренний мандрен удаляется, к игле присоединяется шприц для аспирации с заранее набранным 3 мл раствором гепарина. В шприц набирается 10-20 мл костного мозга, затем по мере наполнения шприца костный мозг переливают в стерильный мешок. Необходимый объем костномозговой взвеси около 100-150 мл (рисунок 14).

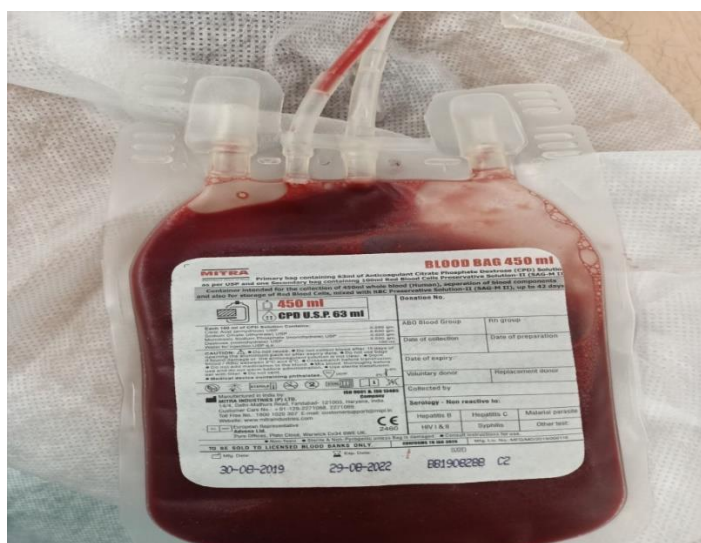


Рисунок 14 – Миелоэкфузия (стерильный мешок с костномозговой смесью в количестве 100 мл)

После набора определенного количества мешок с костномозговой взвесью заворачивают в стерильную салфетку, подписывают фамилией пациента

(повторно проводят процедуру двойной идентификации), затем в течение 30 минут передают в лабораторию клеточных технологий. Одновременно выполняется забор периферической крови на анализ CD-характеристик клеток (2 ml).

### 3.2.2 Этап 2 – изоляция мезенхимальных стволовых клеток

В дальнейшем, все манипуляции с костным мозгом осуществляются в ламинарном шкафу для изоляции от бактериальной контаминации биоматериала. Для дифференциации ядродержащих клеток костный мозг центрифугируют в течение 30 мин при 1250 градусах. В последующем появляются три различных слоя:

- верхний слой: плазма;
- нижний слой: эритроциты с примесью зрелых гранулоцитов;
- средний слой: лейкоцитарный слой с добавлением эритроцитов, содержащих ядродержащие клетки.

В качестве среды для дифференциации мезенхимальных стволовых клеток применялась среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). Эта среда имеет в составе витамины, аминокислоты, пируват натрия, неорганические соли, феноловый красный, NEPES, D-Глюкозу. Использовался коммерчески подходящий готовый раствор, в который включали 10 мл/л пенициллина-натриевой соли, 25 мг амфотерицина, 3700 мг/л бикарбоната натрия, 10 тыс. мг стрептомицина. Данная среда хранится при 4°C. Перед применением в данную среду добавляют 10 мл фетальной сыворотки (FBS) до получения 10 % раствора сыворотки. Перед использованием среду подогревают до 37°C.

Биоптат губчатого костного мозга перемешивают со средой и культивируют до получения взвеси, затем ее центрифугируют для отделения костного мозга от кусочков костей, различных материалов. Клетки костного мозга, имеющие в своем составе красные и белые клетки крови и МСК, разделившиеся путем обработки взвеси через шприцы с иглами размером 16G, 18G и 20G. Суспензия отдельно взятых клеток, которая состоит из  $50-100 \times 10^6$  нуклеарных клеток, далее была распределена на 100мм чашках для выделения стволовых клеток из клеток суспензии. Клеточные гранулы распределялись на 70 % растворе Percoll и центрифугировались в течение 15 мин. Осадок состоит из 3-х частей: клетки низкой плотности, состоящие из 25 % (фракция тромбоцитов); клетки высокой плотности (50 % осадка) – мононуклеарные клетки, средняя плотность 1,10 г/мл; красные клетки крови (25 % осадка) – со средней плотностью 1,14 г/мл. Адгезивные клетки находились во фракции клеток низкой плотности (из фракции тромбоцитов). Далее клетки костного мозга выращивались и приклеивались к поверхности чашки Петри в течение от 1 до 7 дней. Склеивание клеток наблюдалось первые 3 дня, после чего количество прилипших клеток не увеличивалось. Через три дня неприлипшие клетки извлекались из культуры заменой первичной среды свежей культуральной средой. В последующем замена культуральной среды осуществлялась через каждые 4 дня пока клетки не сливались, на это уходило от 14 до 21 дней. В итоге

на выходе отмечалось 4-кратное увеличение количества недифференцированных мезенхимальных стволовых клеток.

Получение клеток с культуральных чашек осуществляется с применением 0,25 % трипсина или этилендиамин тетрауксусной кислоты (ЭДТА) однократно. Затем недифференцированные МСК были отмыты культуральной средой для последующего применения.

Клеточную суспензию пропускают через капроновый фильтр, с размером ячеек 100 мкм, центрифугируют в течение 10 мин со скоростью 1500 об/мин. Далее в осадок добавляют питательную среду, содержащую 10% эмбриональную телячью сыворотку, 2 мМ L-глутамин и 0,001 мл раствора антибиотика. Клетки объемом  $8 \times 10^4$  кл/мл выстилают на пластиковые чашки Петри. Выращивание осуществляется в инкубаторе при давлении 5 %  $\text{CO}_2$  и 37°C во влажной среде. Качество клеточной среды рассчитывается с помощью фазово-контрастной микроскопии. В норме и при хорошем качестве культуры клетки в норме имеют четко различимые границы и морфологию, располагающиеся в виде колоний округлой формы.

Подсчет производился в камере Горяева для оценки жизнеспособности клеток. Оценка стерильности клеточной среды на грибы, микоплазмы, бактерии проводилась в асептических условиях с помощью микробиологических питательных сред.

Клеточная культура признается стерильной при отсутствии роста во всех пробирках. Не стерильной считается культура, когда в одной пробирке есть признаки роста микрофлоры. Плотная питательная среда Сабуро применялась для обнаружения грибов; готовая плотная питательная среда Хоттингера или микоплазменный агар для обнаружения микоплазм. Папилломавирусная инфекция высеивалась с помощью ПЦР-наборов для обнаружения HPV 6 и 11. Для решения особенностей клеточной среды к стволовым клеткам, обнаружения других клеток применяли моноклональные антитела, отмеченные флюорохромами. Моноклональные антитела к CD 44, CD 90, CD45, разводились до определенной концентрации и наносились на фиксированные клетки на 30-60 минут, в последующем трижды промывались в фосфатно-буферном растворе и подвергались анализу на проточном флуоресцентном микроскопе. Готовая суспензия стволовых клеток заливалась в стерильные флаконы, на которые имелись этикетки с указанием данных больных, названия и характеристики клеток (количество), даты забора, культивации и трансплантации. Транспортировка данных клеточных культур проводилась в специальном контейнере с температурой 25-37°C.

Количество мезенхимальных стволовых клеток зависит от биологического резерва клеток костного мозга, зависящих от возраста больного, длительности заболевания (хронический патологический стресс). Способность мезенхимальных стволовых клеток к размножению и дифференцировке находится в прямой пропорциональной зависимости от возраста мужчин. МСК костного мозга в процессе культивирования определяют по изменению характеристик самих клеток, по популяционной активности стволовых клеток,

применяя в качестве среды DMEM, содержащую 0,4 мкМ инсулина, 10% фетальной телячьей сыворотки; 10 мкМ 2-меркаптоэтанола; 0,05 мкг/мл этаноламина; 50 мкг/мл гентамицина.

Микроскопически определяют состояние клеточных культур, проводят подсчет активности клеток, то есть жизнеспособность и выживаемость клеток по окраске трипановым синим.

### **3.3 Оценка эффективности терапии**

Оценка эффективности терапии проводилась на основании данных спермограммы и данных гормонального профиля, которая предполагает, что эффективность и безопасность аутотрансплантации МСК в лечении необструктивной азооспермии имеет положительный эффект.

Оценка безопасности исследования проводилась по:

- наличию или отсутствию нежелательных явлений;
- своевременности их выявления;
- борьбы по предотвращению возникновения осложнений.

Нежелательные явления – это те события, которые могут привести к угрозе для жизни, инвалидизации, значительной потере трудоспособности, увеличения длительности нахождения в стационаре; смертельному исходу.

*Параметры безопасности:*

Отсутствие критических нарушений жизненно важных органов во время миелоэкспузии и в течение 2 недель после нее:

- нарушения ритма сердца, приведшее остановку сердечной деятельности;
- анафилактический шок;
- нарушения дыхания с падением SpO<sub>2</sub> <90 %;
- ТЭЛА легочной артерии.

Отсутствие осложнений во время миелоэкспузии:

- непрекращающееся кровотечение в результате повреждения кровеносного сосуда.

Отсутствие осложнений после аутотрансплантации в течение последующих 2-х недель:

- нагноение послеоперационной раны;
- остеомиелит;
- гематома в области послеоперационной раны.

### **3.4 Методы исследования**

#### **3.4.1 Обследование перед началом исследования**

Процедура забора костного мозга проводилась в условиях стационара в АО «ННМЦ» с соблюдением всех правил асептики и антисептики.

Во время госпитализации все пациенты проходили стандартное обследование, в соответствии с рисунком 15.

Лабораторные обследования:
Общий анализ крови (с лейкоцитарной формулой)
Общий анализ мочи
Биохимический анализ крови (общий белок, глюкоза, общий холестерин, АЛТ, АСТ, общий и прямой билирубин, креатинин, мочевины)
Коагулограмма (ПТИ, МНО, протромбиновое время, фибриноген, АЧТВ)
Исследование на онкомаркеры: СА 19-9, СУFRA, S-100, РЭА, SCCA, СА 72-4, ПСА (общий и свободный)
Анализ на кариотипирование, на микроделецию Y-хромосомы
Исследование крови на гормоны (тестостерон, пролактин, ЛГ, ФСГ, эстрадиол, ингибин В, ТТГ)
ИФА: HBsAg, ВИЧ, HBc
Инструментальные обследования:
УЗИ органов мошонки
УЗИ мочевого пузыря, ТРУЗИ предстательной железы, объем остаточной мочи
ЭКГ
Рентген грудной клетки

Рисунок 15 – Перечень лабораторных и инструментальных методов обследования

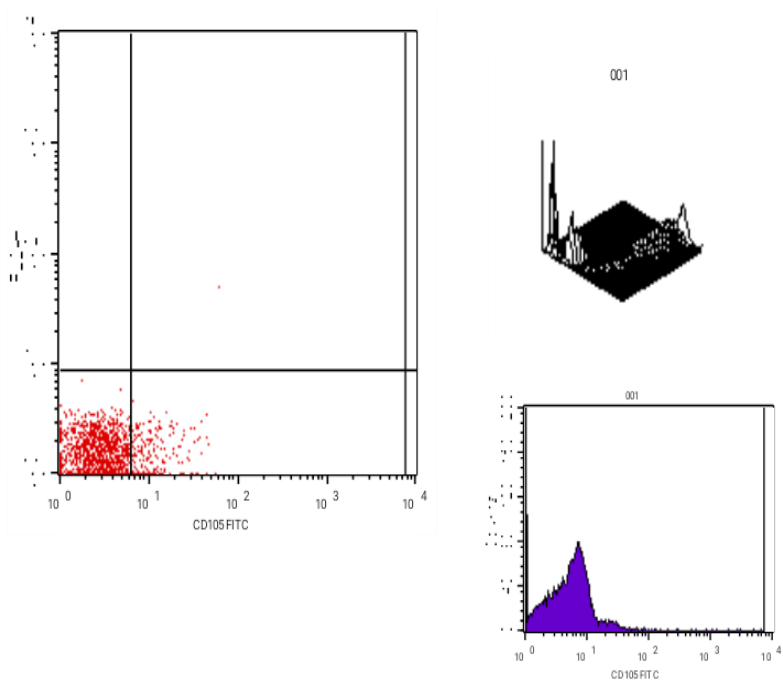
### 3.4.2 Изучение фенотипа МСК

Следующий параметр был измерен однократно с помощью проточной цитофлюориметрии FACS Calibur фирмы Becton Dickinson.

#### *Техника выполнения проточной цитометрии*

Данные проточной цитофлюориметрии были получены на анализаторе FACS Calibur, оборудованном тремя лазерами. Сбор и тщательный анализ данных выполнялся с помощью программного обеспечения BD FACSDiva™ (версия 6.1.3).

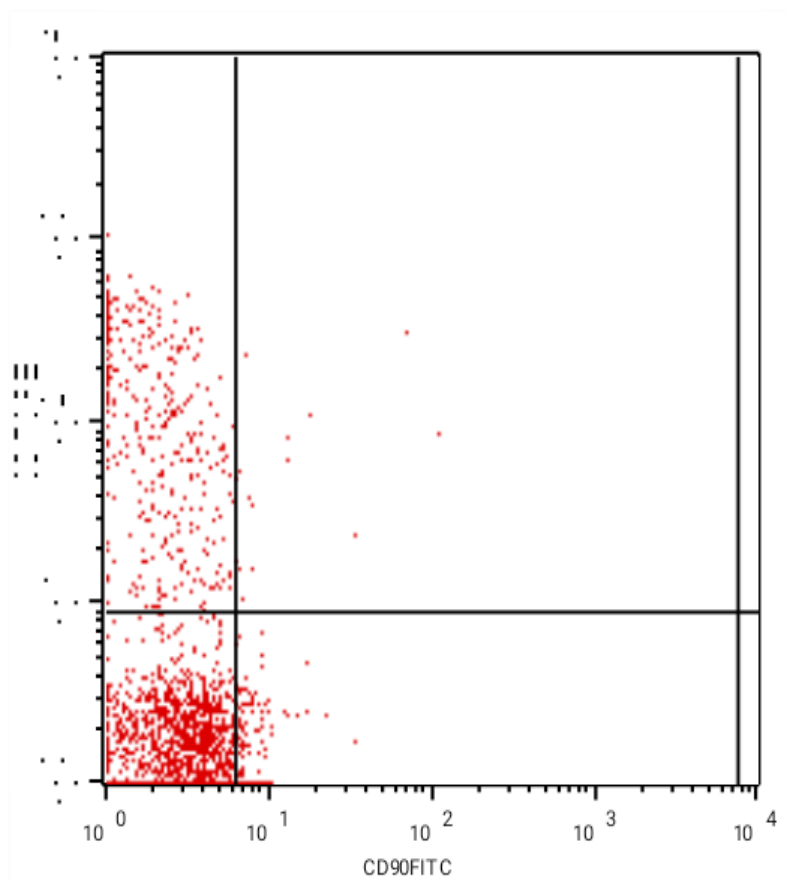
Образцы с реагентами приготавливали в пробирках по 5 мл. Перед применением в каждую пробирку добавляли около 100мкл образца. Пробирки выводили при температуре 36°C в течение 20 минут. В последующем пробирки помещали на лед и анализировали в течение 1 часа. Пробирки были окрашены бычьим сывороточным альбумином (BSA) в течение 20 минут. Пробирки подвергали центрифугированию при 1400 оборотов в течение 10 минут при комнатной температуре. Надосадочную жидкость выкачивали и пробирки хранили на льду в темноте. Эритроциты, находящиеся в пробирках, разрушали с помощью 2 мл лизирующего буфера BD PharmLyse в течение 10 минут. В последующем пробирки центрифугировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Супернатанты выкачивали, а гранулы ресуспендировали в 300 мкл буфера. Содержимое всех пробирок было соединено в одну трубку, помещенную на лед и защищенную от прямых солнечных лучей. Образцы были получены на цитометре (рисунок 16, таблица 10).



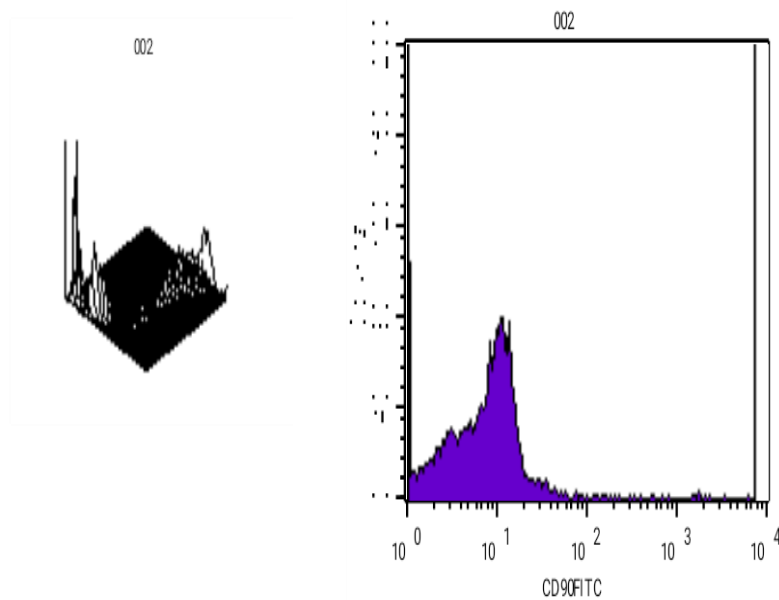
а

а – CD105

Рисунки 16 – Маркеры клеток костного мозга после проточной цитометрии, лист 1



б



в

б – CD90; в – CD90

Рисунки 16, лист 2

Таблица 10 – Фенотип клеточного состава костного мозга у пациентов с НОА

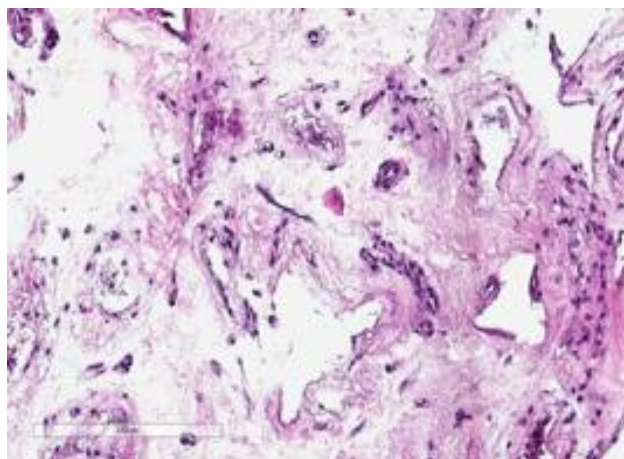
CD-маркеры клеток костного мозга	Уровень в образце костного мозга у пациентов с НОА, %
CD4+ Т-лимфоциты	1,24±0,12
CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты	2,45±0,17
CD3+ все лимфоциты	3,12
CD73+ МСК	4,92
CD25+	3,42
CD20+В-лимфоциты	1,69
CD16+NK-клетки	5,67
CD117+	0,1
CD45+	3,15
CD34+ГСК	1,79
CD105+	4,28
CD45+CD34+	79,47
CD105+CD34+	85,23
CD4+CD25+ Т-эффекторы	71,06

### 3.4.3 Гистологическое исследование ткани яичек

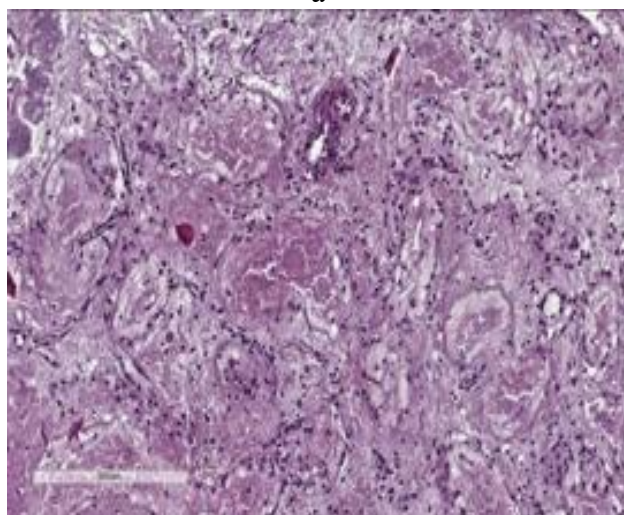
При биопсии оценивают гистологическую картину биоптата: гипосперматогенез; аплазию половых клеток; склероз канальцев.

В тканях яичка при гистологическом исследовании, окрашенным гематоксилином и эозином, имеются фрагменты ткани яичка, представленные

многочисленными семенными канальцами, общим числом от 30 до 50 (в одном поле зрения, при УВх10), видны семенные канальцы без клеток, в состоянии склероза и гиалиноза, среди которых видны немногочисленные канальцы с наличием клеток Сертоли (в пределах до 5-7 канальцев) и первичных сперматоцитов и сперматогоний с отеком стромы, местами полностью обтурацией просвета канальцев. Зрелые сперматозоиды не обнаружены. Базальная мембрана без изменений. В строме склероз с участками гиалиноза (рисунок 17).



а



а – канальцы с наличием клеток Сертоли; б – сперматозоиды не обнаружены

Рисунок 17 – Ткани яичек при гистологическом исследовании

Примечание – В строме склероз с участками гиалиноза

#### 3.4.4 Статистические методы обработки результатов

Статистическая обработка данных производилась с помощью программного обеспечения R и Excel (Microsoft Office 2016).

Проверку гипотезы нормальности распределения количественных признаков проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка и визуального анализа гистограмм распределения данных. Так как основной объем



количественных данных не характеризовался нормальным распределением, то применяли непараметрические критерии. Числовые данные в работе представлены в формате: среднее/медиана [25%; 75% квартиль].

При сопоставлении двух независимых выборок по количественным признакам использовали двухсторонний критерий Манна-Уитни. Оценка результатов лечения проводилась с применением двухстороннего критерия Уилкоксона.

В работе использовались следующие виды статистических графиков:

- гистограммы распределения величин;
- диаграммы типа «ящик с усами», где представлены медиана, интерквартильный размах, наибольшее/наименьшее значение выборки, которые располагались в пределах расстояния 1,5 значения интерквартильного размаха и выбросы.

### **3.5 Дизайн исследования**

С учетом вышеизложенных методов исследования, данное исследование можно классифицировать как:

Экспериментальное: проведенное вмешательство – трансплантация аутологичных костномозговых мезенхимальных стволовых клеток больным со вторичной необструктивной азооспермией.

Нерандомизированное. В группу лечения попали пациенты со вторичной НОА и отсутствием эффекта от любого вида лечения.

Типовая модель – исследование в одной группе.

## 4 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

На рисунке 18 представлен набор и дальнейшая тактика ведения пациентов с диагнозом необструктивная азооспермия.

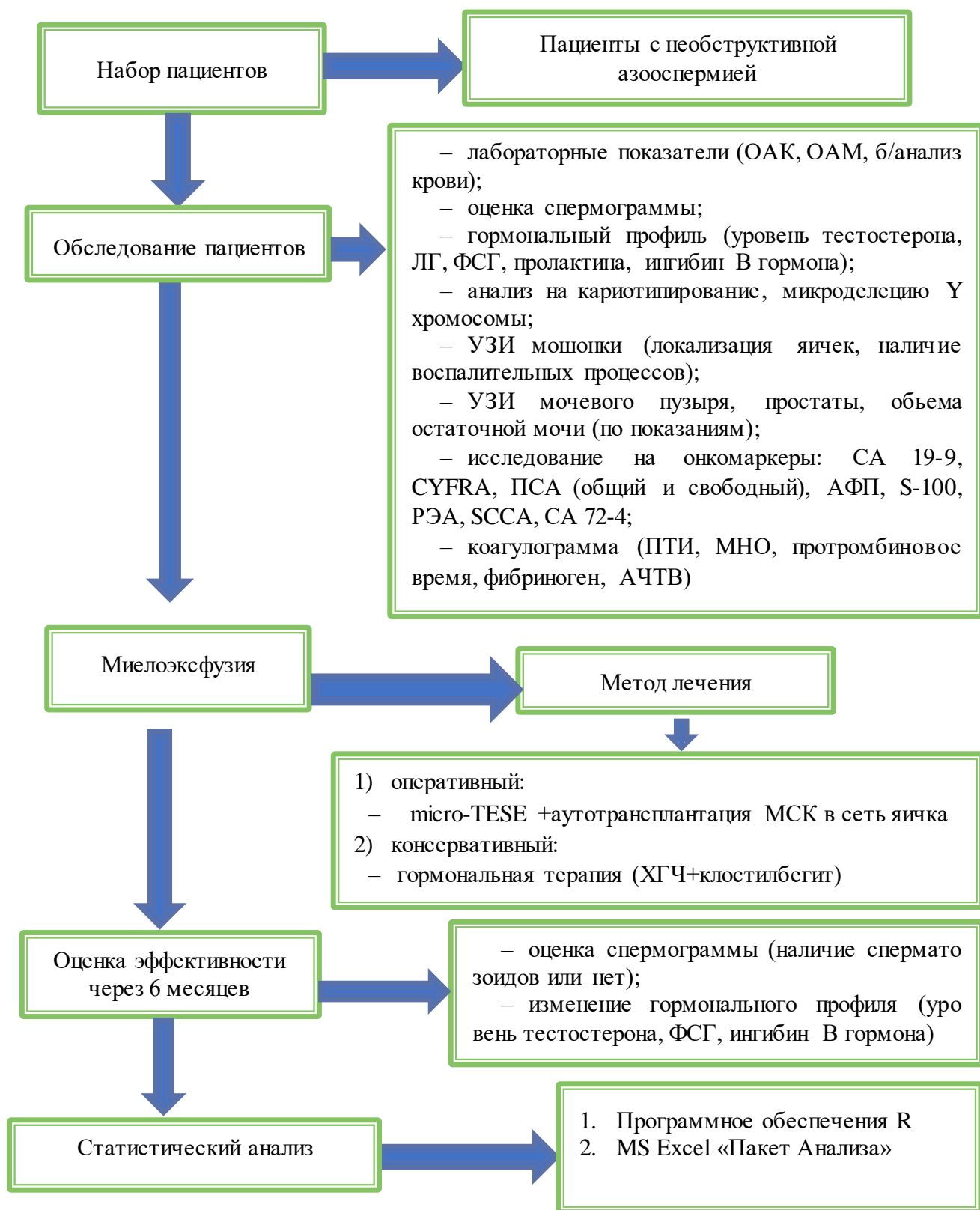


Рисунок 18 – Набор и тактика ведения пациентов

На рисунке 19 представлен дизайн нашего исследования.

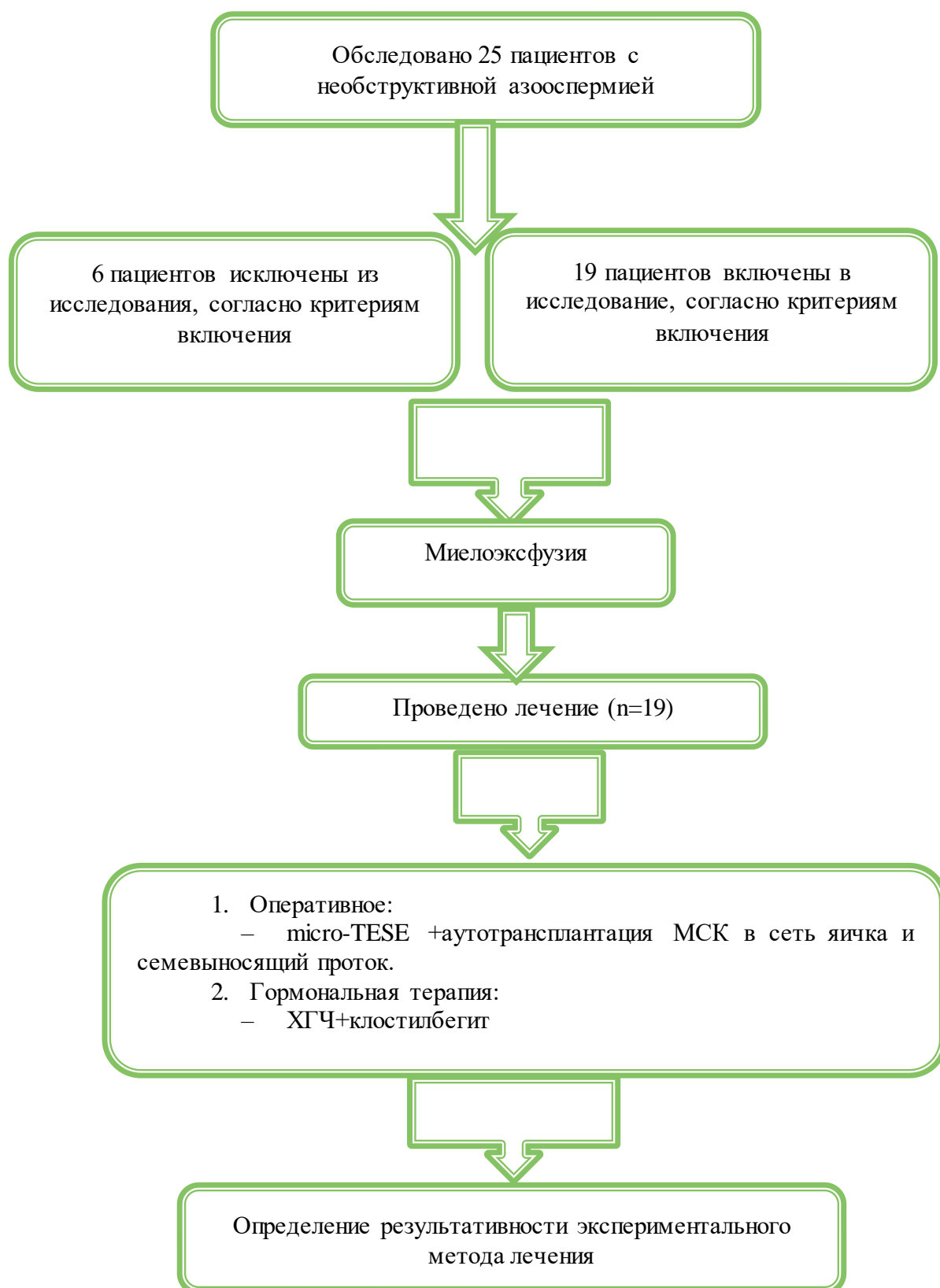


Рисунок 19 – Дизайн исследования

#### 4.1 Методы обследования пациентов

Согласно критериям включения, все пациенты были обследованы согласно схеме, включающей данные анамнеза, сбора жалоб, анализа медицинской документации, клинического обследования, данных спермограммы (рисунок 20).

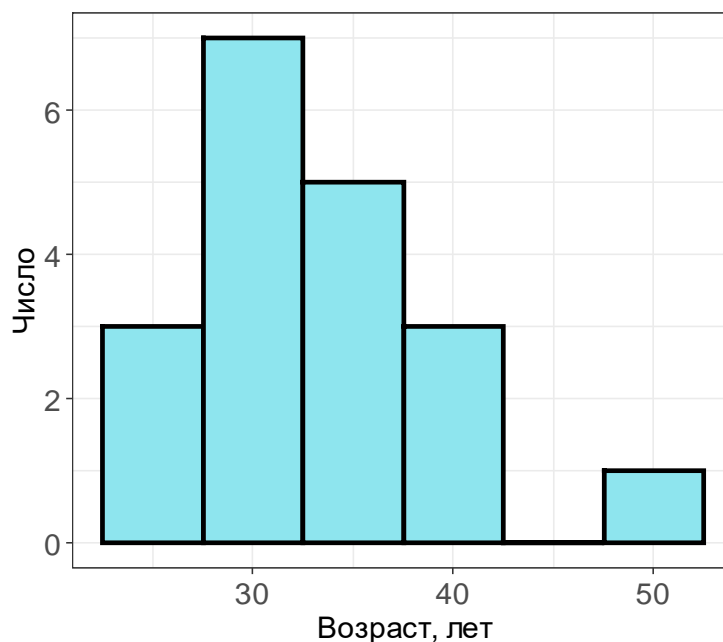


Рисунок 20 – Распределение пациентов по возрасту

Физикальное обследование включало общий осмотр пациентов с определением типа телосложения, характера оволосения, состояния грудных желез, осматривали общее состояние пациента, развитие наружных половых органов.

#### 4.2 Андрологическое исследование

Включало: обследование органов мошонки, оценка размеров яичек, определение объема яичек, а также состояние придатков яичек; обследование предстательной железы. Объем яичек осуществлялся при помощи орхидометра Прадера (норма – более 15 см<sup>3</sup>), а также при помощи УЗИ органов мошонки.

Для оценки объема тестикул проводилось УЗИ органов мошонки на аппарате Philips clear Vue 650 с использованием линейного датчика с частотой 7,5 МГц.

Проводилось УЗИ мочевого пузыря ТРУЗИ предстательной железы, объем остаточной мочи (по показаниям).

#### 4.3 Спермограмма

Оценка качества спермы проводилась в соответствии с рекомендациями ВОЗ, 2012 г. путем световой микроскопии микроскопом Olympus 41 CX (Япония) и камерами Маклера (Olympus 41 CX, Япония). Спермограмму анализировали

двукратно. Забор эякулята проводился в одноразовые стерильные контейнеры Sarstedt (Австралия) путем мастурбации при половом воздержании до 4 дней.

#### **4.4 Гормональный профиль**

Согласно лабораторным обследованиям исследовались показатели уровней общего тестостерона, ФСГ, ингибина В, ЛГ, пролактина в сыворотке крови. Нормальные показатели ЛГ (1,7-8,6 мМЕ/мл), ФСГ (1,5-12,4 мМЕ/мл), тестостерона (2,80-8,00 нмоль/л), пролактина (4,6-21,4 нг/мл) определялись на автоматическом анализаторе Vitros 3600 (Johnson and Johnson, США) методом хемилюминесценции, а уровни ингибина В (25-325 пг/мл) методом ИФА с использованием наборов Beckman Coulter (США). Забор крови осуществлялся в утреннее время натощак из венозной крови в пробирку типа «вакутейнер». Онкомаркеры определяли методом ИФА на биохимическом анализаторе COBAS INTEGRA 400 Architect 8000 (Abbott).

База исследований – лаборатория КДЛ «Олимп», «Invitro».

#### **4.5 Генетические исследования**

С целью исключения генетически обусловленных причин необструктивной азооспермии проводили: молекулярно-генетическое исследование (то есть определение микроделеции Y-хромосом) и кариотипирование в клинике АО «ЭКОМЕД плюс».

При записи формулы кариотипирования в норме вначале определяется общее число хромосом, затем через запятую указывается полный состав половых хромосом, без пробелов.

Кариотипирование проводили по стандартной методике на культивированных лимфоцитах периферической крови с использованием окрашивания по критериям ISCN (Международная номенклатура цитогенетики человека, 2013).

Все пациенты, которым выставлен диагноз: необструктивная азооспермия: соматически здоровы, без вредных привычек, различных заболеваний, которые могут повлиять на сперматогенез, генетические отклонения у наших пациентов отсутствовали. Наследственный анамнез не отягощены.

#### **4.6 Методы лечения**

Перед проведением миелоэкспузии, всем пациентам проводилось дообследование согласно протоколу №15 «Приложение 1 к клиническому протоколу диагностики и лечения «Описание оперативного и диагностического вмешательства» от «10» ноября 2016 года. Исходя из результатов дообследования, пациенты подписывали информированное согласие на забор костного мозга, то есть миелоэкспузию (Приложение В).

*Подготовка к операции экспузии костного мозга*

Пациент укладывается на стол, на живот. Проводится первичная хирургическая обработка послеоперационного поля (от поясицы до с/3 ягодиц). Операционное поле обкладывается простынями, закрепляется зажимами. На

стерильном столе находится весь необходимый инструментарий для забора костного мозга. Для профилактики тромбоэмболии на операционном столе готовят раствор антикоагулянта (гепарин). В стеклянную банку 0,5 л наливают 250 мл среды с добавлением 10 мл раствора гепарина. В последующем, в каждую емкость для промывания шприцов добавляют по 40 мл этого раствора.

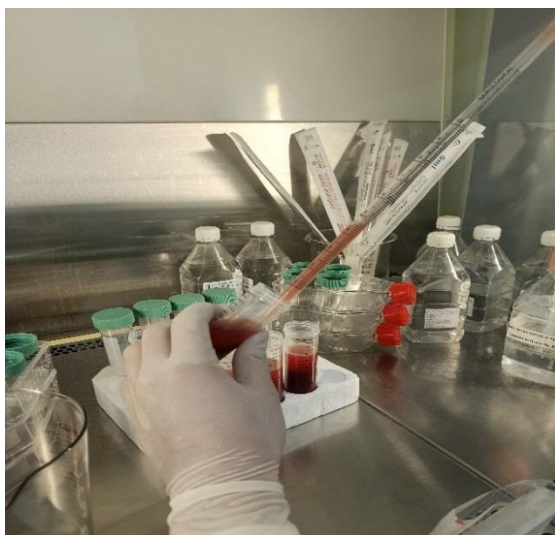
#### *Получение костномозговой взвеси*

Хирург с помощью специальной иглы для пункций костного мозга производит прокол подздошной кости больного, поворачивая ее по и против часовой стрелки. Хирург специальную иглу вводит в подздошную кость на глубину 2-4 см в зависимости от толщины кости. Вынимает мандрен и дальше присоединяет к игле шприц. В последующем медленно вытаскивает иглу из кости, поворачивая ее вокруг своей оси и временами натягивая поршень шприца, для захвата как можно большего количества костномозговой взвеси. Общее количество взвеси за один вкол должно быть не более 10 мл, при увеличении данного объема повышается степень разведения периферической кровью костного мозга. В последующем данную взвесь врач передает медсестре, предварительно извлекая иглу со шприцем. Медсестра, выливает костномозговую взвесь, не отсоединяя иглу от шприца в металлическую емкость и промывает иглу и шприц специальным раствором из емкости для промывки. Костномозговую взвесь в металлической емкости периодически перемешивают стеклянной палочкой, которую после протирают салфеткой. Забор завершают, когда набрали необходимое количество клеток.

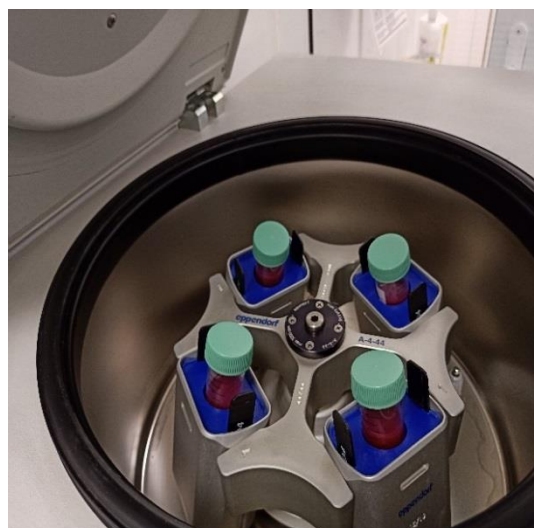
#### *Обработка костномозговой взвеси*

После забора необходимого количества костномозговой взвеси, проводится ее обработка с дальнейшим извлечением попавших при пункции кусочков костей и получения однородной клеточной суспензии. Из металлической емкости аккуратно переливают в другую емкость через шприц без поршня в сетку с крупными ячейками. При появлении затруднения оттока взвеси, при образовании сгустков, используют поршень шприца. Данную процедуру повторяют несколько раз. Костномозговую взвесь с помощью шприца переносят в мешки, маркируют и отправляют в центр клеточных технологий (рисунок 21).

Количество ядродержащих клеток, необходимое для получения во время забора для аутологичной трансплантации составляет –  $1-3 \times 10^6$ /кг веса (рисунки 22, 23).



а



б



в



г



а – удаление супернатанта (надосадочной жидкости) для последующего лизирования;  
 б – центрифугирование; в – клетки высевают на посуду для культивирования с плотностью  $1,29 \times 10^2$  кл/см<sup>2</sup>; г – выделенные клетки; д – клетки культивируют в течении от 24-72 часов при 37°C в инкубаторе, в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> и с 95%-й влажности

Рисунок 21 – Центр клеточных технологий



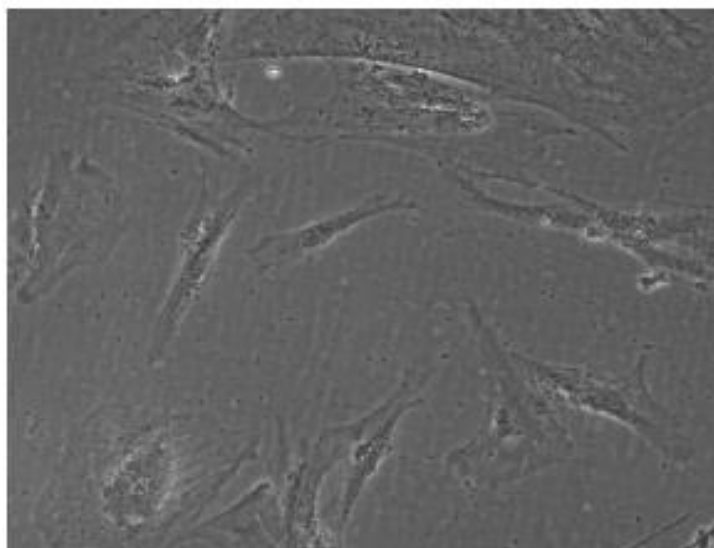


Рисунок 22 – Первичная культура МСК костного мозга

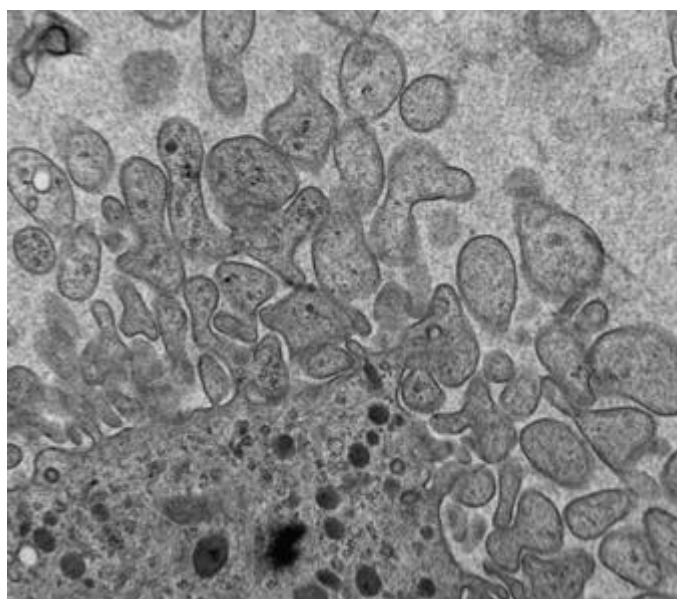


Рисунок 23 – Клетки костного мозга после культивирования

После культивирования пациенты проходят дообследование на микро-TESE и аутотрансплантацию мезенхимальных стволовых клеток (рисунок 24). Предварительно их осматривает анестезиолог и если нет противопоказаний для проведения оперативного лечения, пациенты заполняют информированное согласие.



Лабораторные обследования:
Общий анализ крови (с лейкоцитарной формулой)
Общий анализ мочи
ИФА: HBsAg, HBc; ВИЧ
Обследование на инфекции:
- Ig G (хламидии, цитомегаловирус, уреаплазма, микопlasма, герпес, трихомониаз); - Ig M (хламидии, цитомегаловирус, уреаплазма, микопlasма, герпес, трихомониаз)
Биохимический анализ крови (общий белок, мочеви́на, креатинин, глюкоза, АЛТ, АСТ, билирубин общий, билирубин прямой)
Коагулограмма (ПТИ, МНО, ТВ, фибриноген, АЧТВ)
Исследование крови на гормоны (тестостерон, пролактин, ЛГ, ФСГ, эстрадиол, ингибин В, ТТГ)
Мазок из уретры
Спермограмма
Консультация терапевта (после сдачи анализов)
Консультация анестезиолога (в клинике перед операцией)

Рисунок 24 – Перечень обследований на проведение micro-TESE

*Протокол операции micro-TESE и аутотрансплантации МСК в сеть яичка*

После 3-х кратной обработки операционного поля раствором йодоната, под перидуральной анестезией, производят продольный разрез в срединной мошоночной области, длиной 3 см. Послойно, с гемостазом, вскрывают оболочки левого яичка, последнее выделяют: серо-голубого цвета, малых размеров, мягко - эластической консистенции, придаток не изменен. Острым путем поперечно, длиной около 3 см вскрывают белочную оболочку яичка, гемостаз. Ткань яичка деликатно вывихивают кнаружи. Под операционным микроскопом с 16-40 кратном увеличением, производят тщательный поиск и отбор перспективных (больших по размеру) канальцев яичек и их забор для эмбриологического и гистологического исследования (рисунок 25).

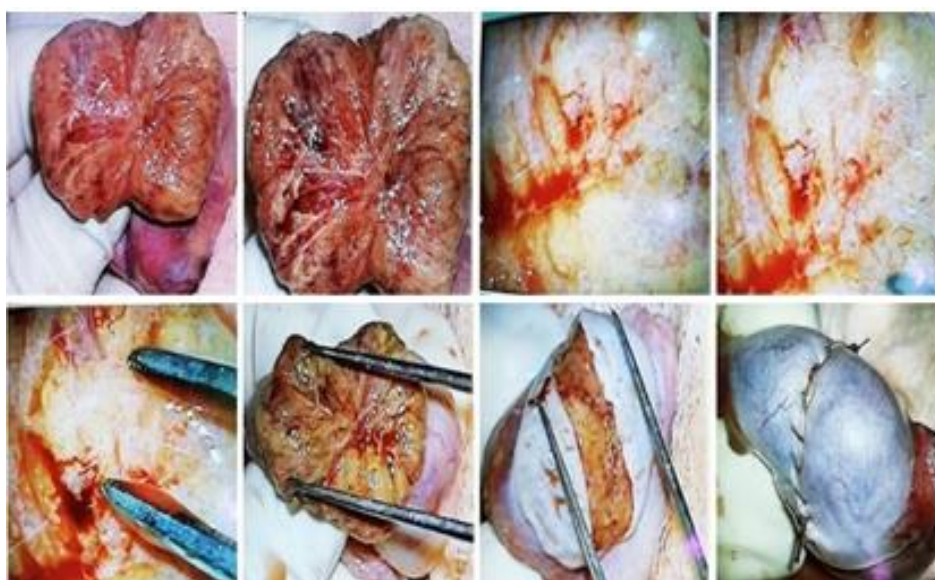


Рисунок 25 – Micro-TESE (извитые канальцы яичка)

Полученный материал в операционной передавался врачу-эмбриологу для механической обработки исследования содержимого канальцев и поиска сперматозоидов.

Согласно заключению врача-эмбриолога в материале не были обнаружены сперматозоиды для выполнения программа ЭКО - ИКСИ и криоконсервации.

В извитые канальцы введено было 0,3 мл, содержащих  $10^7$  мезенхимальных стволовых клеток. В семявыносящий проток также введено было 0,3 мл, содержащих  $10^7$  мезенхимальных стволовых клеток (рисунок 26).



Рисунок 26 – Аутотрансплантация МСК в сеть яичка

После окончания работы на правом яичке, белочная и влагалищные оболочки ушивались. Гемостаз.

Аналогичная манипуляция произведена на контрлатеральном левом яичке. Послойное ушивание раны. Бетадин. Асептическая повязка.

Согласно заключению врача-эмбриолога в материале не были обнаружены сперматозоиды для выполнения программа ЭКО-ИКСИ и криоконсервации.

В извитые канальцы введено было 0,3 мл, содержащих  $10^7$  мезенхимальных стволовых клеток. В семявыносящий проток также введено было 0,3 мл, содержащих  $10^7$  мезенхимальных стволовых клеток.

Гемостаз. Оболочки придатка ушиты викрилом №5.

Послойно ушивание раны. Бетадин. Асептическая повязка.

## 5 ЛЕЧЕНИЕ НОА

Пациенты (n=19) получали комбинированную терапию препаратами хорионического гонадотропина в дозе, которая составила 1500 ЕД 2 раза в неделю внутримышечно и клостилбегита в дозе 50 мг 1 таблетка 1 раз в день. Эффективность лечения оценивалась через 6 месяцев. Под эффективностью терапии понималось обнаружение сперматозоидов в эякуляте, улучшение показателей гормонального фона и соответственно наступление беременности у партнерши (таблица 13).

Таблица 13 – Характеристика пациентов после лечения

Пациент	Возраст	ФСГ	ЛГ	Тестостерон	Пролактин	Ингибин В	Спермограмма
P1	26	16,7	8,08	9,35	18,5	27,5	1-2 в п/зр
P2	38	12	7,6	23,8	15,4	10,5	
P3	37	11	6,75	6,32	19,5	27	1-2 в п/зр
P4	34	12,4	8,4	7,87	14,3	8,6	
P5	35	12,3	6,7	7,56	8,3	10,3	
P6	29	36,6	25,5	5,87	7,8	11,7	
P7	30	14,3	5,98	9,65	9,5	12,8	
P8	31	13,08	7,89	12,76	16,3	27,8	1-2 в п/зр
P9	31	13,2	8,09	7,65	14,5	18,7	
P10	37	12,08	12,08	6,34	19,5	22,8	
P11	28	15,7	6,7	7,43	13,5	12,8	
P12	33	19,6	7,23	9,34	10,5	15,7	
P13	32	12,07	6,83	6,21	5,4	8,5	
P14	35	10,54	3,98	9,76	13,4	19,5	
P15	42	23,21	8,5	19,06	16,4	16,7	
P16	48	2,76	45	5,76	15,3	24,5	
P17	26	43,2	7,9	7,83	19,5	27	1-2 в п/зр
P18	24	11,45	5,3	14,3	27	28,3	
P19	39	16,9	11,67	5,43	16,71	12,4	

### 5.1 Изменения гормонального профиля у пациентов с необструктивной азооспермией после аутотрансплантации МСК

Анализ структуры мужского бесплодия показал, что основными патогенетическими факторами развития его являются эндокринный и инфекционно-воспалительный факторы. Эндокринный фактор является лидирующим. Из эндокринных факторов мужского бесплодия наибольшую частоту демонстрирует гипогонадизм (рисунки 27, 28, 29, 30, 31).

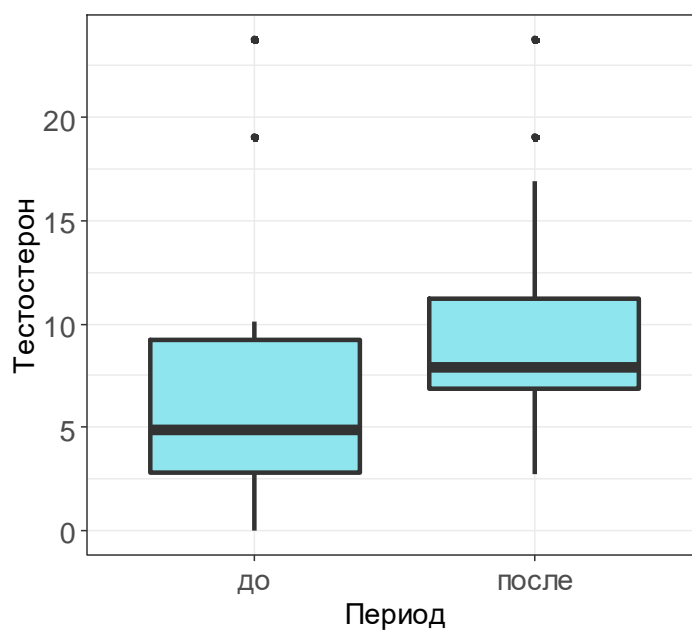


Рисунок 27 – Сопоставление уровней тестостерона до и после лечения

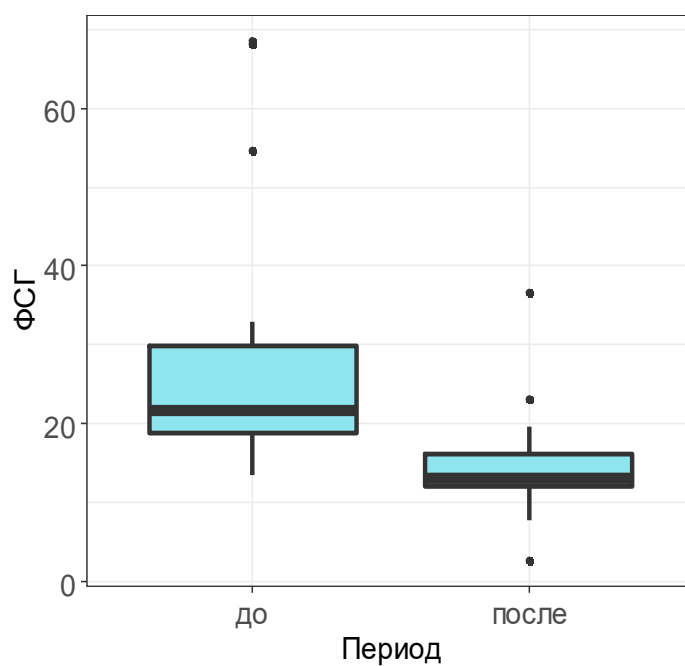


Рисунок 28 – Сопоставление уровней ФСГ до и после лечения

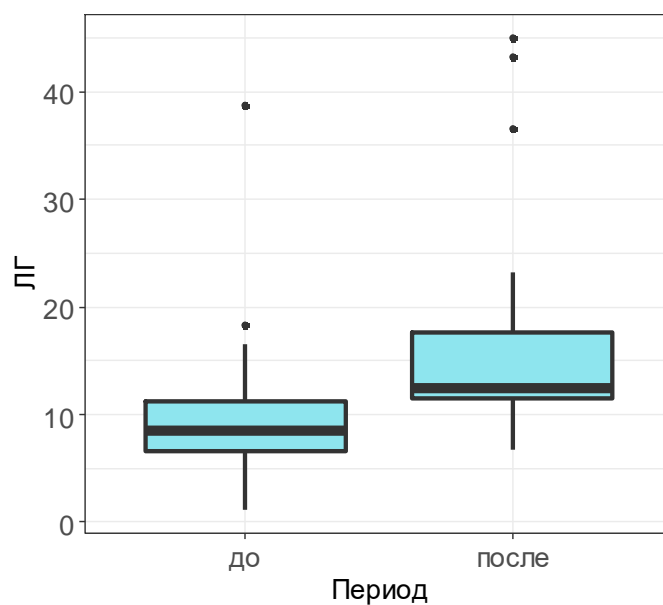


Рисунок 29 – Сопоставление уровней ЛГ до и после лечения

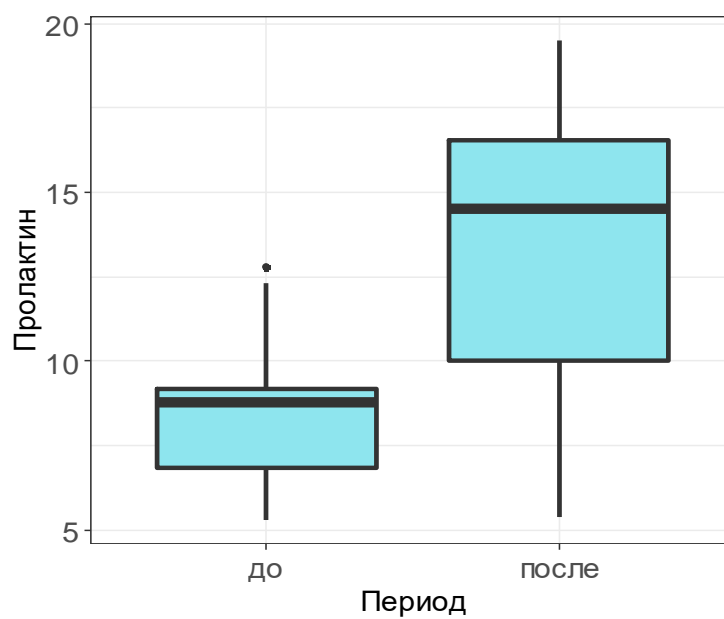


Рисунок 30 – Сопоставление уровней пролактина до и после лечения

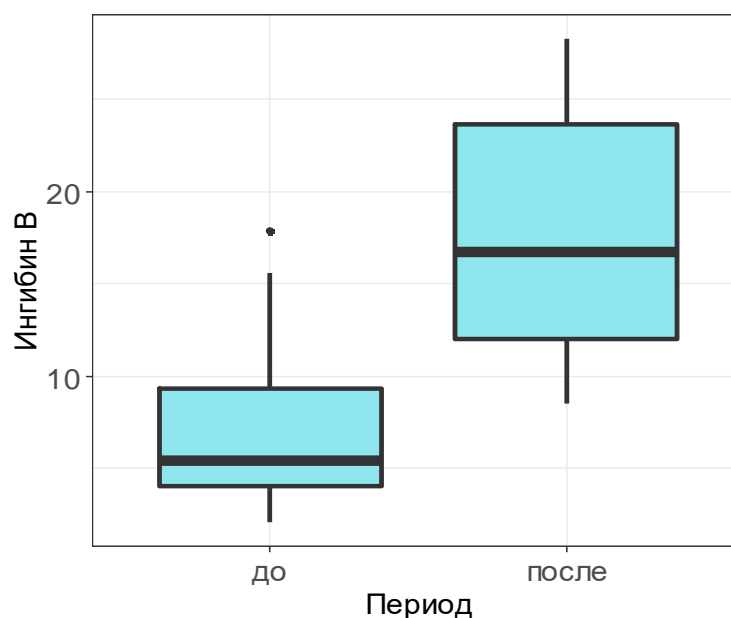


Рисунок 31 – Сопоставление уровней ингибина В до и после лечения

## 5.2 Результаты применения различных методов стимулирующей терапии при необструктивной азооспермии

Терапия кломифеном и ХГЧ, наряду с незначительным увеличением уровня тестостерона, ингибина В, и снижением ФСГ приводила к статистически незначительному обнаружению числа сперматозоидов (таблица 14).

Таблица 14 – Показатели результатов до и после лечения

Показатель	До лечения	После лечения	Эффект (после – до лечения)	р
Тестостерон	6.82/4.88 [2.78; 9.2]	10.04/7.87 [6.88; 11.26]	3.22/3.5 [2.93; 4.91]	0.002
ФСГ	28.62/21.72 [18.86; 29.8]	14.56/13.08 [12.04; 16.2]	-14.06/-8.79 [-12.18; -6.36]	<0.001
ЛГ	10.37/8.56 [6.54; 11.22]	17.31/12.4 [11.56; 17.65]	6.94/4.64 [2.26; 7.83]	0.003
Пролактин	8.45/8.8 [6.86; 9.19]	13.74/14.5 [10; 16.56]	5.29/6.2 [1.85; 9.75]	<0.001
Ингибин В	7.22/5.4 [4.05; 9.31]	17.52/16.7 [12.05; 23.65]	10.3/10.43 [7.04; 14]	<0.001
Спермограмма, млн/мл	0 у всех	1-2 млн/мл у 4 пац.	-	

По всем показателям достигнут положительный эффект не менее чем в 75 % случаев. Уровень статистической значимости, оцененный с помощью двухстороннего критерия Уилкоксона не превысил 0,003 ни по одному показателю.

### Сопоставление групп пациентов с улучшениями и без улучшений

У 4 пациентов зафиксирован благополучный исход – удалось получить 1-2 млн./мл в спермограмме. Возникает вопрос поиска предикторов благополучного исхода лечения. Можно рассмотреть два вопроса:

- 1) предикторы в исходном состоянии до лечения;
- 2) какие изменения происходят у пациента с благополучным исходом.

Несмотря на то, что размер групп достаточно маленький было проведено сопоставление показателей. Полученный результат должен послужить материалом для дальнейшего более глубокого исследования предложенной методики на большей выборке.

Для ответа на первый вопрос производилось сопоставление показателей до лечения (таблица 15).

Таблица 15 – Показатели до лечения

Показатель	Группа с благополучным исходом	Группа без результата	p
Возраст	29.5/27.5 [26; 31]	34.3/34 [30.5; 37.5]	0.146
Тестостерон	6.8/6.89 [4.64; 9.05]	6.82/4.46 [2.66; 8.96]	0.530
ФСГ	33.86/26.7 [22.74; 37.83]	27.22/21.3 [18.86; 28.63]	0.530
ЛГ	12.37/11.87 [10.45; 13.8]	9.84/7.8 [5.86; 10]	0.124
Пролактин	8.63/8.96 [8.3; 9.29]	8.4/8.54 [6.86; 9.19]	0.689
Ингибин В	8.97/10.05 [8.75; 10.27]	6.75/5.2 [3.2; 8.3]	0.098

На основании представленных в таблице данных можно высказать предварительные гипотезы о том, что результаты лечения могут быть лучшими у более молодых пациентов с более высоким уровнем ингибина В.

Для ответа на второй вопрос производится сопоставление показателей после лечения (таблица 16).

Таблица 16 – Показатели после лечения

Показатель	Группа с благополучным исходом	Группа без результата	p
Тестостерон	9.06/8.59 [7.45; 10.2]	10.3/7.87 [6.88; 12.03]	1.000
ФСГ	12.15/12.04 [10.21; 13.98]	15.2/13.2 [12.07; 16.3]	0.395
ЛГ	17.78/10.58 [7.75; 20.61]	17.18/12.4 [11.87; 17.65]	0.530
Пролактин	18.45/19 [17.95; 19.5]	12.48/13.5 [8.9; 15.35]	0.014
Ингибин В	24.75/27.25 [24.42; 27.58]	15.59/12.8 [11.1; 19.1]	0.036

Пациенты с благополучным исходом характеризуются уровнем ингибина В близким к норме (25-325) и более высоким уровнем пролактина 18.45/19 [17.95; 19.5] против 12.48/13.5 [8.9; 15.35].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время мужское бесплодие является важной медико-социальной проблемой, характеризующей высокое внимание врачей, ученых к репродуктивной функции мужчин.

Необструктивная азооспермия является одним из тяжёлых типов мужского бесплодия, характеризуется отсутствием сперматозоидов и клеток сперматогенеза в сперме.

Основными причинами необструктивной азооспермии являются патологии гипофиза; генетические заболевания; нарушения в гормональной регуляции сперматогенеза; первичное поражение тестикулярной ткани; бесконтрольный прием стероидных гормонов.

Проблема диагностики, в особенности лечения мужского бесплодия остается актуальной и по сей день: нет чётких диагностических стандартов у мужчин с диагнозом бесплодие; нет критериев при лечении мужского бесплодия.

В связи с повышенным ростом инфертильности у мужчин, андрологи пытаются выявить основные причины и решить проблему не только диагностики, но и лечения. Большое значение в оценке сперматогенеза имеет исследование состояния паренхимы яичек. Чаще всего для оценки состояния тестикулярной ткани определяют гормональный статус мужчин, а при азооспермии для оценки состояния сперматогенного эпителия проводят micro-TESE.

В нашем исследовании представлена новая терапия micro-TESE на основе аутотрансплантации МСК при лечении вторичной НОА у мужчин. Хотя существует теоретически риск образования тератом при аутотрансплантации МСК, наш собственный опыт и анализ литературы, представленный в обзоре, не выявил связи между введением МСК и появлением новообразований. По гормональному профилю полученные данные дают новую информацию о терапевтической эффективности МСК при вторичном бесплодии.

Данное исследование было нерандомизированным. Терапия МСК также приводила к повышению либидо наших пациентов, возможно за счет повышения уровня тестостерона. Проведенное исследование продемонстрировало, что аутотрансплантация МСК, стимулирующая терапия приводят к повышению уровня тестостерона, ингибина В, снижению уровня ФСГ и стимуляции сперматогенеза у пациентов со вторичной необструктивной азооспермией.

Несмотря на указанные ограничения, положительные результаты данной работы служат основанием для применения нового эффективного клеточно-терапевтического подхода для лечения вторичной необструктивной азооспермии с использованием МСК по данным спермограммы.

На основании проведенного исследования сделаны следующие **выводы**:

1. В полученной культуре костномозговых клеток, выделенной от больных со вторичной НОА, было получено  $1,5 \pm 0,3 \times 10^6$  клеток МСК, из них 95% жизнеспособных с фенотипом CD73, CD90, CD105.



2. Трансплантация аутологичных МСК костного мозга у больных со вторичной НОА является безопасной и хорошо переносимой процедурой, о чем свидетельствовало отсутствие существенных осложнений на протяжении периода наблюдения.
3. После введения аутологичных МСК костного мозга отмечено появление сперматозоидов у пациентов со вторичной НОА.
4. Аутотрансплантация мезенхимальных стволовых клеток снизила уровни ФСГ с 28.62/21.72 (18.86; 29.8) до 14.56/13.08 (12.04; 16.2)  $p < 0.001$ ; повышение уровней тестостерона с 6.82/4.88 (2.78; 9.2) до 10.04/7.87 (6.88; 11.26)  $p = 0.002$ ; ингибина В с 7.22/5.4 (4.05; 9.31) до 17.52/16.7 (12.05; 23.65)  $p < 0.001$ .
5. Положительные результаты данной работы служат основанием для продолжения клинических исследований в области применения клеточных технологий в терапии вторичной необструктивной азооспермии.

### *Практические рекомендации*

Необходимо комплексное обследование с обязательной оценкой эндокринного статуса.

Необходимы дополнительные исследования для проведения повторного экспериментального метода лечения в других центрах, занимающихся лечением мужского бесплодия.

При подготовке мужчин к аутотрансплантации МСК при micro-TESE необходимо использовать стимулирующую сперматогенез терапию гонадотропинами длительностью 6 месяцев.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Glybochko P.V., Alyaev Yu.G., Chaly M.E. et al. Infertility and pathozoospermia after surgical treatment of varicocele // Farmateka. – 2013. – Vol. 3, Issue 256. – S. 35-37.

2 Kaprin A.D., Kostin A.A., Kulchenko N.G. et al. Possibilities of radiological research methods in the diagnosis of idiopathic male infertility // Clinical experience of the G20. – 2013. – Vol. 3, Issue 19. – P. 7-14.

3 Gamidov S.I., Iremashvili V.V., Tkhangopsoyeva P.A. Therapy of fertility disorders in men: promising results of European studies // Effective pharmacotherapy in urology. – 2009. – Vol. 2. – P. 26-30.

4 Efremov E.A., Kasatonova E.V., Melnik Ya.I. et al. Late fatherhood: a review of ejaculate-damaging mechanisms, risks and strategies to overcome them // Effective pharmacotherapy. – 2016. – Vol. 11. – P. 16-33.

5 Shestakova O.V., Tetelyutina F.K. Quality of life and features of the psychoemotional state in a married couple with infertile marriage // Modern problems of science and education. – 2015. – Vol. 6. – P. 146.

6 Moazamian R., Polhemus A., Connaughton H. et al. Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation // Mol. Hum. Reprod. – 2015. – Vol. 21. – P. 502-515.

7 Van der Steeg J., Steures P., Eijkemans M. et al. Role of semen analysis in subfertile couples // Fertil. Steril. – 2011. – Vol. 95. – P. 1013-1019.

8 Walczak-Jedrzejowska R., Wolski J., Slowikowska-Hilczer J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility // Cent. European J. Urol. – 2013. – Vol. 66. – P. 60-67.

9 Кулаков В.И., Назаренко Т.А., Тер-Аванесов Г.В. Бесплодный брак: достижения, проблемы, перспективы // <http://au-health.ru/listview>. 25.04.2021.

10 Селезнева И.Ю. Бесплодный брак: эпидемиологическое исследование: автореф ... канд. мед. наук: 14.00.01, 14.00.33. – М., 1999. – 20 с.

11 Wong W.Y., Thomas C.M.G., Merkus J.M. et al. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors // Fertil Steril. – 2000. – Vol. 73. – P. 435-442.

12 Valenti D., La Vignera S., Condorelli R.A. et al. Follicle-stimulating hormone treatment in normogonadotropic infertile men // Nat. Rev. Urol. – 2013. – Vol. 10. – P. 55-62.

13 Vityazeva I.I., Altashina M.V., Moon T.V. et al. Influence of obesity on the DNA fragmentation index of spermatozoa and outcomes of the IVF program // Problems of Endocrinology. – 2015. – Vol. 61, Issue 5. – S. 48-55.

14 Jungwirth A., Giwercman A., Tournaye H. et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update // Eur Urol. – 2012. – Vol. 62, Issue 2. – P. 324-332.

15 Mascarenhas M.N., Flaxman S.R., Boerma T. et al. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys // PLoS Med. – 2012. – Vol. 9, Issue 12. – P. e1001356-1-e1001356-14.

- 16 Sabanegh E.J., Agarwal A. Male infertility: Campbell-Walsh urology. – Ed. 10th. – Philadelphia: Saunders Elsevier, 2012. – P. 616-647.
- 17 Agarwal A., Mulgund A. et al. A unique view on male infertility around the globe // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2015. – Vol. 13. – P. 37-1-37-8.
- 18 Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion / Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine // *Fertil Steril.* – 2013. – Vol. 99, Issue 1. – P. 63.
- 19 Mehra B.L., Skandhan K.P., Prasad B.S. et al. Male infertility rate: A retrospective study // *Urologia.* – 2018. – Vol. 85, Issue 1. – P. 22-24.
- 20 D'Antonio M., Woodruff G., Nathanson J.L. et al. High-throughput and cost-effective characterization of induced pluripotent stem cells // *StemCellReports.* – 2017. – Vol. 8, Issue 4. – P. 1101-1111.
- 21 Zegers-Hochschild F., Dickens B.M., Dughman-Manzur S. Human rights to in vitro fertilization // *International Journal of Gynecology & Obstetrics.* – 2013. – Vol. 123, Issue 1. – P. 86-89.
- 22 Manual for the Standardised Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple / WHO. – Cambridge: Cambridge University Press, 2000. – 353 p.
- 23 Chiu W.W., Chamley L.W. Use of antisperm antibodies in differential display Western blotting to identify sperm proteins important in fertility // *Hum Reprod.* – 2002. – Vol. 17. – P. 984-989.
- 24 Verstoppen G.R., Steeno O.P. Varicocele and the pathogenesis of the associated subfertility: a review of the various theories. II. Results of surgery // *Andrologia.* – 1977. – Vol. 9. – P. 293-305.
- 25 Evers J.L. et al. Assessment of efficacy of varicocele repair for male subfertility: a systematic review // *Lancet.* – 2003. – Vol. 31. – P. 1849-1852.
- 26 Colpi G.M. et al. Is transrectal ultrasonography a reliable diagnostic approach in ejaculatory duct sub-obstruction? // *Hum. Reprod.* – 1997. – Vol. 12. – P. 2186-2191.
- 27 Rosenwaks Z. et al. The role of maternal age in assisted reproduction // *Hum Reprod.* – 1995. – Vol. 10, Suppl 1. – P. 165-173.
- 28 Nieschlag E., Behre H.M., Nieschlag S. et al. *Andrology – male reproductive health and dysfunction.* – Berlin: Springer, 2010. – 629 p.
- 29 Ghorbel M., Gargouri Baklouti S., Ben Abdallah F. et al. Chromosomal defects in infertile men with poor semen quality // *J Assist Reprod Genet.* – 2012. – Vol. 29, Issue 5. – P. 451-456.
- 30 Vityazeva I.I., Bogolyubov S.V., Bragina E.E. et al. The possibility of obtaining spermatozoa in men with non-mosaic form of Klinefelter's syndrome in in vitro fertilization programs. Literature review and case description // *Andrology and genital surgery.* – 2014. – №3. – P. 16-25.
- 31 Chang E.S., Mykles D.L. Regulation of crustacean molting: A review and our perspectives // *General and Comparative Endocrinology.* – 2011. – Vol. 172, Issue 3. – P. 323-330.
- 32 Дедов И.И., Семичева Т. В., Петеркова В.А. Половое развитие детей: норма и патология. – М.: Медицина, 2002. – 232 с.

- 33 Zivkovic D., Hadziselimovic F. Development of Sertoli cells during mini-puberty in normal and cryptorchid testes // *Urol Int.* – 2009. – Vol. 82, Issue 1. – P. 89-91.
- 34 Tiktinsky O.L., Mikhailichenko V.V. *Andrology.* – M.: MIA, 2010. – 576 p.
- 35 Sagalov A.V. *Outpatient andrology.* – N. Novgorod, 2003. – 240 p.
- 36 Lavina N. *Endocrinology.* – M., 1999. – 1128 p.
- 37 Desai N., Sharma R., Makker K. et al. Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men // *Fertil Steril.* – 2009. – Vol. 92. – P. 1626-1631.
- 38 Kulakov V.I., Leonov B.V., Kuzmichev L.N. *Treatment of female and male infertility.* – M.: MIA, 2010. – 592 p.
- 39 De Kretser D., Baker H. Infertility in men: recent advances and continuing controversies // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1999. – Vol. 84, Issue 10. – P. 3443-3450.
- 40 Diamond D.A., Gargollo P.C., Caldamone A.A. Current management principles for adolescent varicocele // *Fertil Steril.* – 2011. – Vol. 96, Issue 6. – P. 1294-1298.
- 41 Carpi A., Sabanegh E., Mechanick J. Controversies in the management of nonobstructive azoospermia // *Fertil Steril.* – 2009. – Vol. 91. – P. 963-970.
- 42 Yao C., Liu Y., Sun M. et al. MicroRNAs and DNA methylation as epigenetic regulators of mitosis, meiosis and spermiogenesis // *Reproduction.* – 2015. – Vol. 150, Issue 1. – P. R25-R34.
- 43 Galdon G., Atala A. et al. In vitro spermatogenesis: how far from clinical application? // *Curr Urol Rep.* – 2016. – Vol. 17, Issue 7. – P. 49-1-49-12.
- 44 Eiden L.E. Neuropeptide-catecholamine interactions in stress // *Adv Pharmacol.* – 2013. – Vol. 68. – P. 399-404.
- 45 Metelev A.Yu., Bogdanov A.B., Ivkin E.V. et al. Prognostic value of various sperm parameters regarding male fertility // *Andrology and Genital Surgery.* – 2015. – Vol. 16, Issue 4. – P. 51-54.
- 46 Meccariello R., Cobellis G., Fasano S. et al. Modulators of hypothalamic-pituitary-gonadal axis for the control of spermatogenesis and sperm quality in vertebrates // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2014. – Vol. 5. – P. 135-1-135-4.
- 47 *Laboratory manual for the examination and processing of human semen / World Health Organization.* – Ed. 5th. – Geneva. 2010. – 271 p.
- 48 Corradi P.F., Corradi R.B. et al. Physiology of the hypothalamic pituitary gonadal axis in the male // *Urol Clin.* – 2016. – Vol. 43, Issue 2. – P. 151-162.
- 49 Bostwick D.G. *Urologic Surgical Pathology.* – Ed. 3rd. – Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2014. – 1040 p.
- 50 Пашкова Е.Ю., Калинин С.Ю. Мужское бесплодие в XXI веке – реалии и перспективы. Новые возможности использования стимулирующей терапии гонадотропинами // *Эффективная фармакотерапия. Урология.* – 2013. – №1. – С. 26-30.
- 51 Ricci G., Catizone A. Pleiotropic activities of HGF/c-Met System in testicular physiology: paracrine and endocrine implications // *Front Endocrinol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 38-1-38-14.

- 52 Bodey B., Bodey B.Jr., Siegel S.E. et al. Immunocytochemical detection of the homeobox B3, B4, and C6 gene products in childhood medulloblastomas/primitive neuroectodermal tumors // *Anticancer Res.* – 2003. – Vol. 20, Issue 3A. – P. 1769-1780.
- 53 Colaco S., Lakdawala A., Modi D. Role of Y chromosome microdeletions in the clinical evaluation of infertile males // *MGMJ Med Sci.* – 2017. – Vol. 4, Issue 2. – P. 79-88.
- 54 Mieusset R., Bujan L., Massat G. et al. Clinical and biological characteristics of infertile men with a history of cryptorchidism // *Hum Reprod.* – 1995. – Vol. 10. – P. 613-619.
- 55 Sadeghi-Nejad H., Oates R.D. The Y chromosome and male infertility // *Curr Opin Urol.* – 2008. – Vol. 18, Issue 6. – P. 628-632.
- 56 Miller K.D. et al. Fertility after unilateral Cryptorchidism. Paternity, time to conception, pretreatment testicular location and size, hormone and sperm parameters// *Horm. Res.* – 2001. – Vol. 55. – P. 249-253.
- 57 Lee P.A. et al. Fertility after bilateral Cryptorchidism. Evaluation by paternity, hormone and semen data // *Horm. Res.* – 2001. – Vol. 55. – P. 28-32.
- 58 Wong P.M.C., Chung S.-W., Dunbar C.E. et al. Retrovirus-mediated transfer and expression of the interleukin-3 gene in mouse hematopoietic cells result in a myeloproliferative disorder // *Mol. and Cel. Biol.* – 1989. – Vol. 9, Issue 2. – P. 789-808.
- 59 Laven J.S., Haans L.C., Mali W.P. et al. Effects of varicocele treatment in adolescents: a randomised study // *Fertil Steril.* – 1992. – Vol. 58. – P. 756-762.
- 60 Ness R.B., Markovic N., Carlson C.L. et al. Do men become infertile after having sexually transmitted urethritis? An epidemiologic examination // *Fertil Steril.* – 1997. – Vol. 68. – P. 205-213.
- 61 van Diest P.J., Brugal G., Baak J.P. Proliferation markers in tumors: interpretation and clinical value // *J. Clin Pathol.* – 1998. – Vol. 51. – P. 716-724.
- 62 Cunningham K.A., Beagley K.W. Male genital tract chlamydial infection: implications for pathology and infertility // *Biol Reprod.* – 2008. – Vol. 79, Issue 2. – P. 180-189.
- 63 Bishop J.M. The molecular genetics of cancer // *J. Science.* – 1987. – Vol. 235. – P. 305-311.
- 64 Anthony C.T., Rosselli M., Skinner M.K. Actions of the testicular paracrine factor (P-Mod-S) on Sertoli cell transferrin secretion throughout pubertal development // *Endocrinology.* – 2012. – Vol. 129. – P. 353-360.
- 65 Setchell B.P. Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and Spermatogenesis // *Adv Exp Med Biol.* – 2008. – Vol. 636. – P. 212-233.
- 66 Cuo Y., Hai Y., Hou J. et al. Long-term culture and significant expansion of human Sertoli cells whilst maintaining stable global phenotype and AKT and SMAD1/5 activation // *Cell Commun Signal.* – 2015. – Vol. 13. – P. 20-1-20-15.
- 67 Hotaling J., Carrell D.T. Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions // *Andrology.* – 2014. – Vol. 2, Issue 3. – P. 343-350.

- 68 McLachlan R.I., O'Donnell L., Meachem S.J. et al. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man // *Recent Prog Horm Res.* – 2002. – Vol. 57. – P. 149-179.
- 69 Bozhedomov V.A., Guzov I.I., Teodorovich O.V. Immunological causes of childless marriage // *Problemy reprodukcii.* – 2016. – Vol. 6. – P. 57-62.
- 70 Holstein A.F., Roosen-Runge E.C., Schirren C. Illustrated pathology of human spermatogenesis. – Berlin, 1988. – 278 p.
- 71 Middendorff R., Müller D., Wichers S. et al. Evidence for production and functional activity of nitric oxide in seminiferous tubules and blood vessels of the human testis // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1997. – Vol. 82. – P. 4154-4161.
- 72 Huynh T., Mollard R., Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility // *Hum. Reprod. Update.* – 2002. – Vol. 8, Issue 2. – P. 183-198.
- 73 Aitken R.J., Bowie H., Buckingham D. et al. Sperm penetration into a hyaluronic acid polymer as a means of monitoring functional competence // *J. Androl.* – 1992. – Vol. 13, Issue 1. – P. 44-54.
- 74 Koehler K.E. et al. Recombination and nondisjunction in humans and flies // *Hum. Mol. Genet.* – 1996. – Vol. 5. – P. 1495-1504.
- 75 Xu H., Shen L., Chen X. et al. mTOR/P70S6K promotes spermatogonia proliferation and spermatogenesis in Sprague Dawley rats // *Reprod Biomed Online.* – 2016. – Vol. 32, Issue 2. – P. 207-217.
- 76 Garolla A., Ghezzi M., Cosci I. et al. FSH treatment in infertile males candidate to assisted reproduction improved sperm DNA fragmentation and pregnancy rate // *Endocrine.* – 2017. – Vol. 56, Issue 2. – P. 416-425.
- 77 Yao C., Sun M., Yuan Q. et al. MiRNA-133b promotes the proliferation of human Sertoli cells through targeting GLI3 // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, Issue 3. – P. 2201-2219.
- 78 Сенников С.В., Лопатникова Ю.А., Киреев Ф.Д. и др. Аутоантитела к цитокинам: биологическая и патогенетическая роль // *Цитокины и воспаление.* – 2015. – Т. 14, №2. – С. 5-11.
- 79 Ballabio A., Bardoni B., Carozzo R. et al. Contiguous gene syndromes due to deletions in the distal short arm of the human X-chromosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – Vol. 86, Issue 24. – P. 10001-10005.
- 80 Tiktinsky O.L., Mikhailichenko V.V. *Andrology.* – SPb.: Media Press, 1999. – 464 p.
- 81 Клетки Сертоли // [https://en.wikipedia.org/wiki/Sertoli\\_cell](https://en.wikipedia.org/wiki/Sertoli_cell). 15.04.2021.
- 82 Weidner W. et al. Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis // *Hum. Reprod. Update.* – 1999. – Vol. 5. – P. 421-432.
- 83 Maduro M.R., Lo K.C., Chuang W.W. et al. Genes and male infertility: what can go wrong? // *J. Androl.* – 2003. – Vol. 24, Issue 4. – P. 485-493.
- 84 Zhiborev B.N. Diseases of the reproductive system in the pathogenesis of reproductive health disorders in men // *Urology.* – 2008. – Vol. 3. – P. 62-67.
- 85 Simoni M., Tuttelmann F., Gromoll J. et al. Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Munster experience // *Reprod Biomed Online.* – 2008. – Vol. 16. – P. 289-303.

- 86 Kleiman S.E., Yogev L., Lehavi O. et al. The likelihood of finding mature sperm cells in men with AZFb or AZFb-c deletions: six new cases and a review of the literature (1994-2010) // *Fertil Steril.* – 2011. – Vol. 95. – P. 2005-2012.
- 87 Esteves S.C., Agarwal A. Novel concepts in male infertility // *Int Braz J Urol.* – 2011. – Vol. 37. – P. 5-15.
- 88 Kleiman S.E., Almog R., Yogev L. et al. Screening for partial AZFa microdeletions in the Y chromosome of infertile men: is it of clinical relevance? // *Fertil Steril.* – 2012. – Vol. 98. – P. 43-47.
- 89 Hamada A.J., Esteves S.C., Agarwal A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia // *Clinics (Sao Paulo).* – 2013. – Vol. 68, Suppl 1. – P. 39-60.
- 90 Gogolevsky P.A., Gogolevskaya I.K. Y-chromosome and male infertility (literature review) // *Problems of reproduction.* – 1999. – Vol. 5, Issue 5. – P. 26-34.
- 91 Chernykh V.B., Kurilo L.F., Polyakov A.V. Y-chromosome, AZF microdeletions and idiopathic male infertility // *Problems of reproduction.* – 2001. – Vol. 5, Issue 7. – P. 47-58.
- 92 Navarro-Costa P., Plancha C.E., Goncalves J. Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? // *J Biomed Biotechnol.* – 2010. – Vol. 2010. – P. 936569-1-936569-22.
- 93 Repping S., Skaletsky H., Lange J. et al. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure // *Am J Hum Genet.* – 2002. – Vol. 71. – P. 906-922.
- 94 Choi J., Song S.H., Bak C.W. et al. Impaired spermatogenesis and gr/gr deletions related to Y chromosome haplogroups in Korean men // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 7, Issue 8. – P. e43550-1-e43550-8.
- 95 Ferlin A., Moro E., Rossi A. et al. Role of the AZFa candidate genes in male infertility // *J of Endocr Invest.* – 2000. – Vol. 23, Issue 10. – P. 646-651.
- 96 Foresta C., Moro E. et al. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis // *Endocr. Rev.* – 2001. – Vol. 22, Issue 2. – P. 226-239.
- 97 Krausz C., Quintana-Murci L., Mc Elreavey K. Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis // *Hum. Reprod.* – 2000. – Vol. 5, Issue 7. – P. 1431-1434.
- 98 Zobkova G.Yu., Baranova E.E., Donnikov A.E. et al. Spectrum of azoospermia factor (AZF) deletion in men with normal and impaired spermatogenesis // *Problems of reproduction.* – 2017. – Vol. 23, Issue 4. – P. 109-113.
- 99 Volkov A.N., Tsurkan E.V. PTsR diagnostics of AZF microdeletion in establishing the genetic causes of male infertility // *Medicine in Kuzbass.* – 2016. – Vol. 3. – P. 23-27.
- 100 Gelisio P., Frigato F., Magnanini P. et al. XYY-syndrome. Report of a case // *Minerva Endocrinol.* – 1991. – Vol. 16, Issue 4. – P. 199-201.
- 101 Kucheria K., Mc Elreavey K., Fellous M. The present status of our understanding of human sex determination // *Cytogenet Cell Genet.* – 1997. – Vol. 77. – P. 113.



102 Krausz C., Hoefsloot L., Simoni M. et al. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013 // *Andrology*. – 2014. – Vol. 2, Issue 1. – P. 5-1.

103 Liu X.H., Qiao J., Li R. et al. Y chromosome AZFc microdeletion may not affect the outcomes of ICSI for infertile males with fresh ejaculated sperm // *J Assist Reprod Genet.* – 2013. – Vol. 30. – P. 813-819.

104 Гончарова Н.Н., Мартышкина Е.Ю., Казначеева Т.В. и др. Медико-генетические аспекты бесплодия // *Акушерство, гинекология и репродукция*. – 2012. – №2. – С. 35-40.

105 Hopps C.V., Mielnik A., Goldstein M. et al. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions // *Hum Reprod.* – 2003. – Vol. 18. – P. 1660-1665.

106 Vogt P.H., Bender U. Human Y chromosome microdeletion analysis by PCR multiplex protocols identifying only clinically relevant AZF microdeletions // *Methods Mol Biol.* – 2013. – Vol. 927. – P. 187-204.

107 Bozhedomov V.A., Rokhlikov I.M., Tretyakov A.A. et al. Topical problems of care rendered to childless couples with male factor infertility: clinical, organizational, and methodical aspects // *Andrology and Genital Surgery*. – 2013. – Vol. 14, Issue 4. – P. 7-16.

108 Mustafa M., Sharifa A.M., Hadi J. et al. Male and female infertility: causes, and management // *Journal of Dental and Medical Sciences*. – 2019. – Vol. 18, Issue 9. – P. 27-32.

109 Rim K-T. Reproductive toxic chemicals at work and efforts to protect workers' health: a literature review // *Saf Health Work*. – 2017. – Vol. 8, Issue 2. – P. 143-150.

110 Anawalt B.D, Bebb R.A., Matsumoto A.M. et al. Serum inhibin B level reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1996. – Vol. 81, Issue 9. – P. 3341-3345.

111 Dong Z.Y., Yu H., Xiu H.M. et al. Expression of inhibin B subunits in the testicular tissues of azoospermia patients with different pathological alterations // *Zhonghua Nan Ke Xue*. – 2008. – Vol. 14, Issue 1. – P. 20-22.

112 Andersson A.M., Petersen J.H., Jorgensen N. et al. Serum inhibin B and follicle-stimulating hormone levels as tools in the evaluation of infertile men: significance of adequate reference values from proven fertile men // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2004. – Vol. 89, Issue 6. – P. 2873-2879.

113 Pierik F.H., Abdesselam S.A., Vreeburg J.T.M. et al. Increased serum inhibin B levels after varicocele treatment // *Clin Endocrinol.* – 2001. – Vol. 54, Issue 6. – P. 775-780.

114 Pierik F.H. et al. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1998. – Vol. 83, Issue 9. – P. 3110-3114.

115 Manzoor S.M., Sattar A. et al. Serum inhibin B as a diagnostic marker of male infertility // *J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad*. – 2012. – Vol. 24, Issue 3-4. – P. 113-116.

116 Huang X., Bai Q., Yan L. et al. Combination of serum inhibin B and follicle-stimulating hormone levels can not improve the diagnostic accuracy on

testicular sperm extraction outcomes in Chinese non-obstructive azoospermic men // *J. Chinese Medical Journal*. – 2012. – Vol. 125, Issue 16. – P. 2885-2889.

117 Matzuk M.M., Lamb D.J. The biology of infertility: research advances and clinical challenges // *Nat Med*. – 2008. – Vol. 14. – P. 1197-1213.

118 Quilter C.R., Svennevik E.C., Serhal P. et al. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening of a random group of infertile males // *Fertil Steril*. – 2003. – Vol. 79. – P. 301-307.

119 Aziz N. The importance of semen analysis in the context of azoospermia // *Clinics (Sao Paulo)*. – 2013. – Vol. 68, Suppl 1. – P. 35-38.

120 Esteves S.C., Miyaoka R., Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male [corrected] // *Clinics (Sao Paulo)*. – 2011. – Vol. 66. – P. 691-700.

121 Esteves S.C., Agarwal A. The azoospermic male: current knowledge and future perspectives // *Clinics (Sao Paulo)*. – 2013. – Vol. 68, Suppl 1. – P. 1-4.

122 Kuiri-Hänninen T., Sankilampi U., Dunkel L. Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: minipuberty // *Horm Res Paediatr*. – 2014. – Vol. 82, Issue 2. – P. 73-80.

123 Esteves S.C., Prudencio C., Seol B. et al. Comparison of sperm retrieval and reproductive outcome in azoospermic men with testicular failure and obstructive azoospermia treated for infertility // *Asian J Androl*. – 2014. – Vol. 16. – P. 602-606.

124 Esteves S.C., Agarwal A. Reproductive outcomes, including neonatal data, following sperm injection in men with obstructive and nonobstructive azoospermia: case series and systematic review // *Clinics (Sao Paulo)*. – 2013. – Vol. 68, Suppl 1. – P. 141-150.

125 Evaluation of the azoospermic male / Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in Collaboration with Society for Male Reproduction and Urology // *Fertil Steril*. – 2008. – Vol. 90. – P. 74-77.

126 Krausz C., Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility // *Nat Rev Urol*. – 2018. – Vol. 15, Issue 6. – P. 369-384.

127 Esteves S.C. Clinical management of infertile men with nonobstructive azoospermia // *Asian J Androl*. – 2015. – Vol. 17, Issue 3. – P. 459-470.

128 Esteves S.C., Lee W., Benjamin D.J. et al. Reproductive potential of men with obstructive azoospermia undergoing percutaneous sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection according to the cause of obstruction // *J Urol*. – 2013. – Vol. 189, Issue 1. – P. 232-237.

129 Miyaoka R., Esteves S.C. Predictive factors for sperm retrieval and sperm injection outcomes in obstructive azoospermia: do etiology, retrieval techniques and gamete source play a role? // *Clinics (Sao Paulo)*. – 2013. – Vol. 68, Suppl 1. – P. 111-119.

130 Thonneau P., Marchand S., Tallec A. et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989) // *Hum Reprod*. – 1991. – Vol. 6, Issue 6. – P. 811-816.

131 Ron-El R., Strassburger D., Friedler S. et al. Extended sperm preparation: an alternative to testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia // *Hum Reprod*. – 1997. – Vol. 12, Issue 6. – P. 1222-1226.

- 132 Schoor R.A., Elhanbly S., Niederberger C.S. et al. The role of testicular biopsy in the modern management of male infertility // *J Urol.* – 2002. – Vol. 167, Issue 1. – P. 197-200.
- 133 Tournaye H., Krausz C., Oates R.D. Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment // *Lancet Diabetes Endocrinol.* – 2017. – Vol. 5, Issue 7. – P. 544-553.
- 134 Palermo G.D., Cohen J., Alikani M. et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility // *Fertil Steril.* – 1995. – Vol. 63. – P. 1231-1240.
- 135 Schlegel P.N. et al. Testiculate sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia // *Urology* – 1997. – Vol. 49. – P. 435-440.
- 136 Wu S., Yan M., Ge R. et al. Crosstalk between Sertoli and Germ Cells in Male Fertility // *Trends Mol. Med.* – 2020. – Vol. 26. – P. 215-231.
- 137 Schjenken J.E., Robertson S.A. Seminal fluid signalling in the female reproductive tract: implications for reproductive success and offspring health // *Adv Exp Med Biol.* – 2015. – Vol. 868. – P. 127-158.
- 138 Esteves S.C., Miyaoka R., Agarwal A. Sperm retrieval techniques for assisted reproduction // *Int Braz J Urol.* – 2011. – Vol. 37. – P. 570-583.
- 139 Belva F., De Schrijver F., Tournaye H. et al. Neonatal outcome of 724 children born after ICSI using non-ejaculated sperm // *Hum Reprod.* – 2011. – Vol. 26. – P. 1752-1758.
- 140 Nischlag E. *Andrology: Men's health and dysfunction of the reproductive system: Per. from English.* – M.: Med. inform. agency, 2005. – 551 p.
- 141 Coutton C., Escoffier J., Martinez G. et al. Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human // *Hum Reprod Update.* – 2015. – Vol. 21. – P. 455-485.
- 142 Гипогонадизм // <https://www.krasotaimedicina.ru/diseases>. 05.04.2021.
- 143 Leao Rde B., Esteves S.C. Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech // *Clinics (Sao Paulo).* – 2014. – Vol. 69. – P. 279-293.
- 144 Baker K., Sabanegh Jr.E. Obstructive azoospermia: reconstructive techniques and results // *Clinics (Sao Paulo).* – 2013. – Vol. 68, Suppl 1. – P. 61-73.
- 145 Esteves S.C., Lee W., Benjamin D.J. et al. Reproductive potential including neonatal outcomes of men with obstructive azoospermia undergoing percutaneous sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection according to the cause of obstruction // *JUrol.* – 2013. – Vol. 189, Issue 1. – P. 232-237.
- 146 Assche E., Bonduelle M., Tournaye H. et al. Cytogenetics of infertile men // *Hum Reprod.* – 1996. – Vol. 11, Suppl 4. – P. 1-24.
- 147 Esteves S.C., Miyaoka R., Orosz J.E. et al. An update on sperm retrieval techniques for azoospermic males // *Clinics.* – 2013. – Vol. 68. – P. 99-110.
- 148 Silber S.J. Microsurgical TESE and the distribution of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia // *Hum Reprod.* – 2000. – Vol. 15, Issue 11. – P. 2278-2284.

- 149 Okada H. et al. Conventional versus microdissection testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia // *Urology*. – 2002. – Vol. 168, Issue 3. – P. 1063-1067.
- 150 Barnhart K.T. Assisted reproductive technologies and perinatal morbidity: interrogating the association // *Fertil. Steril.* – 2013. – Vol. 99. – P. 299-302.
- 151 Михайличенко В.В., Новиков А.И., Фесенко В.Н. и др. Особенности диагностики и лечения азооспермии при бесплодии у мужчин // *Андрол. и генитальная хирургия*. – 2010. – №4. – С. 32-35.
- 152 Castilla J.A., Alvarez C., Aguilar J. et al. Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters // *Hum Reprod.* – 2006. – Vol. 21. – P. 847-851.
- 153 Keel B.A. Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors // *Fertil Steril.* – 2006. – Vol. 85. – P. 128-134.
- 154 Ostad M., Liotta D., Ye Z. et al. Schlegel. Testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia: results of a multibiopsy approach with optimized tissue dispersion // *Urology*. – 1998. – Vol. 52. – P. 692-696.
- 155 Aboyan I.A., Grachev S.V., Pavlov S.V. et al. Structure and correlation of male infertility // *Proceed. of the 8th congr. "Men's Health"*. – Yerevan, 2012. – P. 10.
- 156 Corona G. Medical therapy of the infertile men // *Andrology*. – 2018. – Vol. 6, Suppl. 2. – P. 13.
- 157 Herwig R. et al. Tissue perfusion controlled guided biopsies are essential for the outcome of testicular sperm extraction // *Fertility and sterility*. – 2007. – Vol. 87, Issue 5. – P. 1071-1076.
- 158 Dohle G.R., Elzanaty S., van Casteren N.J. Testicular biopsy: clinical practice and interpretation // *Asian J Androl.* – 2012. – Vol. 14. – P. 88-93.
- 159 Silber S.J. et al. The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility // *Hum. Reproduct.* – 1995. – Vol. 10, Issue 8. – P. 2031-2043.
- 160 Hauser R. et al. Comparison of efficacy of two techniques for testicular sperm retrieval in nonobstructive azoospermia: multifocal testicular sperm extraction versus multifocal testicular sperm aspiration // *Journal of Andrology*. – 2006. – Vol. 27, Issue 1. – P. 28-33.
- 161 Vityazeva I.I. Treatment of infertility in men with non-obstructive azoospermia by microdissection technique for extracting spermatozoa from testicular tissue in an in vitro fertilization program using the technique of intracytoplasmic injection of a single spermatozoon: a review of the literature // *Androl. and genital surgery*. – 2014. – Vol. 15, Issue 2. – P. 6-22.
- 162 Kasatonova E.V., Efremov E.A., Melnik Ya.I. et al. Experience in the use of microsurgical biopsy of the testis and its epididymis in patients with non-obstructive azoospermia // *Experiment and wedge. urol.* – 2014. – Vol. 4. – P. 38-42.
- 163 Hussein A., Ozgok Y., Ross L. et al. Clomiphene Administration for Cases of Nonobstructive Azoospermia: A Multicenter Study // *J Androl.* – 2005. – Vol. 26, Issue 6. – P. 787-791.

164 Ubuka T., Son Y.L., Tobar Y. et al. Central and direct regulation of testicular activity by gonadotropin-inhibitory hormone and its receptor // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2014. – Vol. 5. – P. 8-1-8-14.

165 Витязева И.И., Боголюбов С.В., Дедов И.И. Современные подходы к лечению азооспермии методом микро-ТЕСЕ в программе ЭКО/ИКСИ. Обзор литературы. Часть II // *Проблемы эндокринологии*. – 2013. – №59(5). – С. 47-60.

166 Mikhailichenko V.V., Novikov A.I., Fesenko V.N. et al. Features of the diagnosis and treatment of azoospermia in infertility in men // *Androl. and genital surgery*. – 2010. – Vol. 4. – P. 32-35.

167 Shiraishi K., Ohmi C., Shimabukuro T. et al. Human chorionic gonadotrophin treatment prior to microdissection testicular sperm extraction in nonobstructive azoospermia // *Hum Reprod*. – 2012. – Vol. 27, Issue 2. – P. 331-333.

168 Efficacy and safety of highly purified urinary follicle-stimulating hormone with human chorionic gonadotropin for treating men with isolated hypogonadotropic hypogonadism / European Metrodin HP Study Group // *Fertil Steril*. – 1998. – Vol. 70, Issue 2. – P. 256-262.

169 Akarsu C., Caglar G., Vicdan K. et al. Pregnancies achieved by testicular sperm recovery in male hypogonadotrophic hypogonadism with persistent azoospermia // *Reprod Biomed Online*. – 2009. – Vol. 18, Issue 4. – P. 455-459.

170 Johnson L., Chaturvedi P.K., Williams J.D. Missing generations of spermatocytes and spermatids in seminiferous epithelium contribute to low efficiency of spermatogenesis in humans // *Biol. Reprod*. – 1992. – Vol. 47. – P. 1091-1098.

171 Devroey P., Liu J., Nagy Z. et al. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection // *Fertil Steril*. – 1994. – Vol. 62. – P. 639-641.

172 Belker A.M., Sherins R.J., Dennison-Lagos L. et al. Percutaneous testicular sperm aspiration: a convenient and effective office procedure to retrieve sperm for in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection // *J Urol*. – 1998. – Vol. 160. – P. 2058-2062.

173 Schlegel P.N. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision // *Hum Reprod*. – 1999. – Vol. 14. – P. 131-135.

174 Витязева И.И. Лечение бесплодия у мужчин с необструктивной формой азооспермии методом микродиссекционной техники извлечения сперматозоидов из ткани яичка в программе экстракорпорального оплодотворения с применением техники интрацитоплазматической инъекции единичного сперматозоида: обзор литературы // *Андрол. и генитальная хирургия*. – 2014. – Т. 15, №2. – С. 6-22.

175 Гамидов С., Красова О. Обструктивная азооспермия: современное состояние проблемы // *Врач*. – 2013. – №6. – С. 50-55.

176 Касатонова Е.В., Ефремов Е.А., Мельник Я.И. и др. Опыт применения микрохирургической биопсии яичка и его придатка у пациентов с необструктивной азооспермией // *Эксперимент. и клин. урол*. – 2014. – №4. – С. 38-42.

177 Okada H. et al. Conventional versus microdissection testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia // *Urology*. – 2002. – Vol. 168, №3. – P. 1063-1067.

178 Аляев Ю.Г., Амосов А.В., Алленов С.Н. и др. Получение сперматозоидов методом пункционной биопсии придатка яичка у больных обструктивной азооспемией // *Андрол. и генитальная хирургия*. – 2009. – №2. – С. 97-100.

179 Schlegel P.N. et al. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia // *Urology*. – 1997. – Vol. 49. – P. 435-444.

180 Schlegel P.N., Li P.S. Microdissection TESE: sperm retrieval in nonobstructive azoospermia // *Human Reproduction*. – 1998. – Vol. 4, Issue 4. – P. 439.

181 Ostad M., Liotta D., Ye Z. et al. Testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia: results of a multibiopsy approach with optimized tissue dispersion // *Urology*. – 1998. – Vol. 52. – P. 692-696.

182 Orlic D., Kajstura J., Chimenti S. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium // *Nature*. – 2001. – Vol. 410, Issue 6829. – P. 701-705.

183 Shake J.G., Gruber P.J., Baumgartner W.A. et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects // *Ann Thorac Surg*. – 2002. – Vol. 73, Issue 6. – P. 1919-1925.

184 Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S. et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart // *Circulation*. – 2002. – Vol. 105, Issue 1. – P. 93-98.

185 Morigi M., Rota C., Montemurro T. et al. Life-sparing effect of human cord blood mesenchymal stem cells in experimental acute kidney injury // *Stem Cells*. – 2010. – Vol. 28, Issue 3. – P. 513-552.

186 Webber M.J., Han X., Murthy P. Capturing the stem cell paracrine effect using heparin-presenting nanofibers to treat cardiovascular diseases // *J Tissue Eng Regen Med*. – 2010. – Vol. 4, Issue 8. – P. 600-610.

187 Haider H., Ashraf M. Bone marrow stem cell transplantation for cardiac repair // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2005. – Vol. 288. – P. H2557-H2567.

188 Kim E.D., Crosnoe L. et al. The treatment of hypogonadism in men of reproductive age // *Fertil Steril*. – 2013. – Vol. 99. – P. 721-724.

189 Rabahi N., Chretien Y., Gaouar F. et al. Triple therapy with ursodeoxycholic acid, budesonide and mycophenolate mofetil in patients with features of severe primary biliary cirrhosis not responding to ursodeoxycholic acid alone // *Gastroenterol Clin Biol*. – 2010. – Vol. 34. – P. 283-287.

190 Зуева Е.Е., Куртова А.В., Комарова Л.С. Стволовые клетки. Некоторые биологические особенности и терапевтические возможности // *Гематология*. – 2005. – Т. 6. – С. 705-724.

191 Hempfling W., Grunhage F., Dilger K. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamic action of budesonide in early- and late-stage primary biliary cirrhosis // *Hepatology*. – 2003. – Vol. 38. – P. 196-202.

192 Fang Y.Q., Lv D.X. et al. Case-control study on prednisolone combined with ursodeoxycholic acid and azathioprine in pure primary biliary cirrhosis with high

- levels of immunoglobulin G and transaminases: efficacy and safety analysis // *Medicine (Baltimore)*. – 2014. – Vol. 93, Issue 20. – P. e104-1-e104-8.
- 193 Treiber G., Malfertheiner P. Mycophenolate mofetil for the treatment of primary biliary cirrhosis in patients with an incomplete response to ursodeoxycholic acid // *J Clin Gastroenterol*. – 2005. – Vol. 39. – P. 837-838.
- 194 Poupon R. Evidence-based treatment of primary biliary cirrhosis // *Dig Dis*. – 2014. – Vol. 32. – P. 626-630.
- 195 Kaplan M.M., Bonder A., Ruthazer R. et al. Methotrexate in patients with primary biliary cirrhosis who respond incompletely to treatment with ursodeoxycholic acid // *Dig Dis Sci*. – 2010. – Vol. 55. – P. 3207-3217.
- 196 Shiba H., Wakiyama S., Futagawa Y. et al. Switching from tacrolimus to cyclosporine A to prevent primary biliary cirrhosis recurrence after living-donor liver transplantation // *Int Surg*. – 2013. – Vol. 98. – P. 156-159.
- 197 Dyson J.K., Hirschfield G.M., Adams D.H. et al. Novel therapeutic targets in primary biliary cirrhosis // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. – 2015. – Vol. 12. – P. 147-158.
- 198 Karimi-Shah B.A., Chowdhury B.A. Forced vital capacity in idiopathic pulmonary fibrosis – FDA review of pirfenidone and nintedanib // *N Engl J Med*. – 2015. – Vol. 372. – P. 1189-1191.
- 199 Tsuda M., Moritoki Y., Lian Z.X. et al. Biochemical and immunologic effects of rituximab in patients with primary biliary cirrhosis and an incomplete response to ursodeoxycholic acid // *Hepatology*. – 2012. – Vol. 55. – P. 512-521.
- 200 Myers R.P., Swain M.G., Lee S.S. et al. B-cell depletion with rituximab in patients with primary biliary cirrhosis refractory to ursodeoxycholic acid // *Am J Gastroenterol*. – 2013. – Vol. 108. – P. 933-941.
- 201 Mells G.F., Floyd J.A., Morley K.I. et al. Genome-wide association study identifies 12 new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis // *Nat Genet*. – 2011. – Vol. 43. – P. 329-332.
- 202 Lleo A., Gershwin M.E., Mantovani A. et al. Towards common denominators in primary biliary cirrhosis: the role of IL-12 // *J Hepatol*. – 2012. – Vol. 56. – P. 731-733.
- 203 Dhirapong A., Yang G.X., Nadler S. et al. Therapeutic effect of cytotoxic T lymphocyte antigen 4/immunoglobulin on a murine model of primary biliary cirrhosis // *Hepatology*. – 2013. – Vol. 57. – P. 708-715.
- 204 Saffioti F., Gurusamy K.S., Eusebi L.H. et al. Pharmacological interventions for primary biliary cholangitis: an attempted network meta-analysis // *Cochrane Database Syst Rev*. – 2017. – Issue 3. – P. CD011648-1-CD011648-186.
- 205 Becker A.J., McCulloch E.A., Till J.E. Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived From Transplanted Mouse Marrow Cells // *Nature*. – 1963. – Vol. 197, Issue 4866. – P. 452-454.
- 206 Greenbaum L.E., Wells R.G. The role of stem cells in liver repair and fibrosis // *Int J Biochem Cell Biol*. – 2011. – Vol. 43. – P. 222-229.
- 207 Kim W.H., Matsumoto K., Bessho K. et al. Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis // *Am J Pathol*. – 2005. – Vol. 166. – P. 1017-1028.

- 208 Basma H., Soto-Gutiérrez A., Yannam G.R. et al. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes // *Gastroenterology*. – 2009. – Vol. 136, Issue 3. – P. 990-999.
- 209 Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // *Science*. – 1999. – Vol. 284. – P. 143-147.
- 210 Jiang X. X. et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells // *Blood*. – 2005. – Vol. 105, Issue 10. – P. 4120-4126.
- 211 Chiesa S. et al. Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – Vol. 108, Issue 42. – P. 17384-17389.
- 212 Brezillon N., Kremsdorf D., Weiss M.C. Cell therapy for the diseased liver: from stem cell biology to novel models for hepatotropic human pathogens // *DisModel Mech*. – 2008. – Vol. 1. – P. 113-130.
- 213 Yoshioka Y., Taniai M., Hashimoto E. et al. Clinical profile of primary biliary cirrhosis with features of autoimmune hepatitis: Importance of corticosteroid therapy // *Hepatol Res*. – 2014. – Vol. 44. – P. 947-955.
- 214 Wiesner R.H., Ludwig J., Lindor K.D. et al. A controlled trial of cyclosporine in the treatment of primary biliary cirrhosis // *N Engl J Med*. – 1990. – Vol. 322. – P. 1419-1424.
- 215 Combes B., Emerson S.S., Flye N.L. et al. Methotrexate (MTX) plus ursodeoxycholic acid (UDCA) in the treatment of primary biliary cirrhosis // *Hepatology*. – 2005. – Vol. 42. – P. 1184-1193.
- 216 Chun Y.S., Chaudhari P., Jang Y.Y. Applications of patient-specific induced pluripotent stem cells; focused on disease modeling, drug screening and therapeutic potentials for liver disease // *Int J Biol Sci*. – 2010. – Vol. 6. – P. 796-805.
- 217 Chen Y.-F., Tseng C.-Y., Wang H.-W. et al. Rapid generation of mature hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells by an efficient three-step protocol // *Hepatology*. – 2012. – Vol. 55, Issue 4. – P. 1193-1203.
- 218 Asgari S., Moslem M., Bagheri-Lankarani K. et al. Differentiation and Transplantation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Hepatocyte-like Cells // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2013. – Vol. 9, Issue 4. – P. 493-504.
- 219 Song Z., Cai J., Liu Y. et al. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells // *Cell Research*. – 2009. – Vol. 19, Issue 11. – P. 1233-1242.
- 220 Harding J., Mirochnitchenko O. Preclinical studies for induced pluripotent stem cell-based therapeutics // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289, Issue 8. – P. 4585-4593.
- 221 Lanthier N., Rubbia-Brandt L., Spahr L. Liver progenitor cells and therapeutic potential of stem cells in human chronic liver diseases // *Acta Gastroenterol Belg*. – 2013. – Vol. 76, Issue 1. – P. 3-9.
- 222 Wu N., Liu F., Ma H. et al. HBV infection involving in hepatic progenitor cells expansion in HBV-infected end-stage liver disease // *Hepatogastroenterology*. – 2009. – Vol. 56, Issue 93. – P. 964-967.



- 223 Akkari L., Haouzi D., Binamé F. et al. Cell shape and TGF-beta signaling define the choice of lineage during in vitro differentiation of mouse primary hepatic precursors // *J Cell Physiol.* – 2010. – Vol. 225, Issue 1. – P. 186-195.
- 224 Zhao D., Chen S., Cai J. et al. Derivation and characterization of hepatic progenitor cells from human embryonic stem cells // *PloS One.* – 2009. – Vol. 4, Issue 7. – P. e6468-1-e6468-10.
- 225 Yovchev M.I., Dabeva M.D., Oertel M. Isolation, characterization, and transplantation of adult liver progenitor cells // *Methods Mol Biol.* – 2013. – Vol. 976. – P. 37-51.
- 226 Kuramitsu K., Sverdlov D.Y., Liu S.B. et al. Failure of fibrotic liver regeneration in mice is linked to a severe fibrogenic response driven by hepatic progenitor cell activation // *Am J Pathol.* – 2013. – Vol. 183, Issue 1. – P. 182-194.
- 227 Alison M.R., Islam S., Lim S. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly // *J Pathol.* – 2009. – Vol. 217, Issue 2. – P. 282-298.
- 228 Nakamura T., Torimura T., Sakamoto M. et al. Significance and Therapeutic Potential of Endothelial Progenitor Cell Transplantation in a Cirrhotic Liver Rat Model // *Gastroenterology.* – 2007. – Vol. 133, Issue 1. – P. 91-107.
- 229 Beaudry P., Hida Y., Udagawa T. et al. Endothelial progenitor cells contribute to accelerated liver regeneration // *Journal of Pediatric Surgery.* – 2007. – Vol. 42, Issue 7. – P. 1190-1198.
- 230 Taniguchi E., Kin M., Torimura T. et al. Endothelial progenitor cell transplantation improves survival following liver injury in mice // *Gastroenterology.* – 2006. – Vol. 130, Issue 2. – P. 521-531.
- 231 Russo F.P., Parola M. Stem cells in liver failure // *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* – 2012. – Vol. 26, Issue 1. – P. 35-40.
- 232 Kuo T.K., Hung S.-P., Chuang C.-H. et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells // *Gastroenterology.* – 2008. – Vol. 134, Issue 7. – P. 2111-2121.
- 233 Parekkadan B., van Poll D., Suganuma K. et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure // *PLoS ONE.* – 2007. – Vol. 2, Issue 9. – P. e941-1-t941-7.
- 234 van Poll D., Parekkadan B., Cho C.H. et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo // *Hepatology.* – 2008. – Vol. 47, Issue 5. – P. 1634-1643.
- 235 Amer M.E., El-Sayed S.Z., El-Kheir W.A. et al. Clinical and laboratory evaluation of patients with end-stage liver cell failure injected with bone marrow-derived hepatocyte-like cells // *Eur J Gastroenterol Hepatol.* – 2011. – Vol. 23. – P. 936-941.
- 236 Mohamadnejad M., Alimoghaddam K., Bagheri M. et al. Randomized placebo-controlled trial of mesenchymal stem cell transplantation in decompensated cirrhosis // *Liver International.* – 2013. – Vol. 33, Issue 10. – P. 1490-1496.
- 237 Houlihan D.D., Newsome P.N. Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease // *Gastroenterology.* – 2008. – Vol. 135, Issue 2. – P. 438-450.

238 di Bonzo L.V., Ferrero I., Cravanzola C. et al. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential // *Gut*. – 2008. – Vol. 57, Issue 2. – P. 223-231.

239 Friedenstein A.J., Gorskaja J.F., Kulagina N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs // *Exp Hematol*. – 1976. – Vol. 4. – P. 267-274.

240 Lazarus H., Haynesworth S., Gerson S. et al. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use // *Bone Marrow Transplant*. – 1995. – Vol. 16. – P. 557-564.

241 Mackay M.A., Beck S.C., Murphy J.M. et al. Chondrogenic Differentiation of Cultured Human Mesenchymal Stem Cells from Marrow // *Tissue Engineering*. – 1998. – Vol. 4, Issue 4. – P. 415-428.

242 Muraglia A., Cancedda R., Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model // *J Cell Sci*. – 2000. – Vol. 113, Pt 7. – P. 1161-1166.

243 Askarov M., Tuganbekova S., Shaimardanova G. et al. Algorithm for managing patients with primary biliary cirrhosis on cell therapy. – Astana: JSC "National Scientific Medical Center", 2015. – 19 p.

244 Гржибовский А.М., Иванов С.В., Горбатова М.А. Описательная статистика с использованием пакетов статистических программ Statistica и SPSS // *Наука и здравоохранение*. – 2016. – №1. – С. 7-23.

245 Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytherapy*. – 2006. – Vol. 8, Issue 4. – P. 315-317.

246 Wongchuensoontorn C., Liebehenschel N., Schwarz U. et al. Application of a new chair-side method for the harvest of mesenchymal stem cells in a patient with nonunion of a fracture of the atrophic mandible – A case report // *Journal of Cranio-Maxillo Facial Surgery*. – 2009. – Vol. 37, Issue 3. – P. 155-161.

247 Tsai M.-S., Lee J.-L., Chang Y.-J. et al. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol // *Human Reproduction (Oxford, England)*. – 2004. – Vol. 19, Issue 6. – P. 1450-1456.

248 Zuk P.A., Zhu M., Ashjia P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // *Molecular biology of the cell*. – 2002. – Vol. 13, Issue 12. – P. 4279-4295.

249 Iwata T., Yamato M., Zhang Z. et al. Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use // *Journal of Clinical Periodontology*. – 2010. – Vol. 37, Issue 12. – P. 1088-1099.

250 Kadar K., Kiraly M., Porcsalmy B. et al. Differentiation potential of stem cells from human dental origin-promise for tissue engineering // *J Physiol Pharmacol*. – 2009. – Vol. 60, Suppl 7. – P. 167-175.

251 Royer-Pokora B., Busch M., Beier M. et al. Wilms tumor cells with WT1 mutations have characteristic features of mesenchymal stem cells and express

molecular markers of paraxial mesoderm // Human molecular genetics. – 2010. – Vol. 19, Issue 9. – P. 1651-1668.

252 Niri N.M., Jaberipour M., Razmkhah M. et al. Mesenchymal stem cells do not suppress lymphoblastic leukemic cell line proliferation // Iranian Journal of Immunology. – 2009. – Vol. 6, Issue 4. – P. 186-194.

253 Bühring H.J., Treml S., Cerabona F. et al. Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets // Annals NY Academy of Sciences. – 2009. – Vol. 1176. – P. 124-134.

254 Carmen J., Burger S.R., McCaman M. et al. Developing Assays to address Identity, Potency, Purity and Safety: Cell Characterization in Cell Therapy Process Development // Regen Med. – 2012. – Vol. 7, Issue 1. – P. 85-100.

255 Commission Directive 2009/120/EC of 14 September 2009 Amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community Code Relating to Medicinal Products for Human Use as Regards Advanced Therapy Medicinal Products // <https://ec.europa.eu/health/sites>. 4.04.2021.

256 Guideline on Human Cell-based Medicinal Products (EMA/CHMP/410869/2006) // [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB). 15.02.2021.

257 Donnenberg V.S., Ulrich H., Tárnok A. Cytometry in Stem Cell Research and Therapy // Cytometry A. – 2013. – Vol. 83, Issue 1. – P. 1-4.

258 Shachpazyan N.R., Astrelina T.A., Yakovleva M.V. Mesenchymal stem Cells from Various Human Tissues: Biological Properties, Assessment of Quality and Safety for Clinical Use // Cellular Transplantation and Tissue Engineering. – 2012. – Vol. 7, Issue 1. – P. 23-33.

259 Prockop D.J., Olson S.D. Clinical Trials with Adult Stem/Progenitor Cells for Tissue Repair: Let's not Overlook Some Essential Precautions // Blood. – 2007. – Vol. 109, Issue 8. – P. 3147-3151.

260 Kundrotas G. Surface Markers Distinguishing Mesenchymal Stem Cells from Fibroblasts // Acta Medica Lituanica. – 2012. – Vol. 19, Issue 2. – P. 75-79.

261 Sakaguchi Y., Sekiya I., Yagishita K. et al. Comparison of Human Stem Cells Derived from Various Mesenchymal Tissues: Superiority of Synovium as a Cell Source // Arthritis Rheum. – 2005. – Vol. 52, Issue 8. – P. 2521-2529.

262 Boxall S.A., Cox G., Giannoudis P.V. et al. High abundance of CD271(+) multipotential stromal cells (MSCs) in intramedullary cavities of long bones // Bone. – 2012. – Vol. 50, Issue 2. – P. 510-517.

263 Quirici N., Scavullo C., de Girolamo L. et al. Anti-L-NGFR and -CD34 Monoclonal Antibodies Identify Multipotent Mesenchymal Stem Cells in Human Adipose Tissue // Stem Cells Dev. – 2010. – Vol. 19, Issue 6. – P. 915-925.

264 Arufe M.C. et al. Chondrogenic Potential of Subpopulations of Cells Expressing Mesenchymal Stem Cell Markers Derived from Human Synovial Membranes // J Cell Biochem. – 2010. – Vol. 111, Issue 4. – P. 834-845.

265 Kurth T.B., Dell'Accio F., Crouch V. et al. Functional Mesenchymal Stem Cell Niches in Adult Mouse Knee Joint Synovium in Vivo // Arthritis Rheum. – 2011. – Vol. 63, Issue 5. – P. 1289-1300.

266 Schäffler A., Büchler C. Concise Review: Adipose Tissue Derived Stromal Cells – Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25, Issue 4. – P. 818-827.

267 Moretti P., Hatlapatka T., Marten D. et al. Mesenchymal Stromal Cells Derived from Human Umbilical Cord Tissues: Primitive Cells with Potential for Clinical And Tissue Engineering Applications // Adv Biochem Eng Biotechnol. – 2010. – Vol. 123. – P. 29-54.

268 Domnina A.P., Fridlianskaia I.I., Zemelko V.I. et al. Mesenchymal Stem Cells of Human Endometrium Do Not Undergo Spontaneous Transformation During Long-Term Cultivation // Tsitologiya. – 2013. – Vol. 55, Issue 1. – P. 69-74.

269 Maleki M., Ghanbarvand F., Behvarz M.R. et al. Comparison of Mesenchymal Stem Cell Markers in Multiple Human Adult Stem Cells // Int J Stem Cells. – 2014. – Vol. 7, Issue 2. – P. 118-126.

270 American Type Culture Collection // <http://www.lgcstandards-atcc.org> 17.01.2021.

271 Austin T.W., Lagasse E. Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells // Mechanisms of Development. – 2002. – Vol. 120, Issue 1. – P. 131-135.

272 Willenbring H., Bailey A.S., Foster M. et al. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver // Nature Med. – 2004. – Vol. 10, Issue 7. – P. 744-774.

273 Martin-Rendon E., Watt S.M. Exploitation of stem cell plasticity // Transfus. Med. – 2003. – Vol. 13, Issue 6. – P. 325-349.

274 Романов Ю.А., Смирнов В.Н. Стволовые клетки и регенерация сердца // Кардиологический вестник. – 2007. – №2. – С. 61-63.

275 Vassena R., Eguizabal C., Heindryckx B. et al. Stem cells in reproductive medicine: ready for the patient? // Gul Reprod. – 2015. – Vol. 30. – P. 2014-2021.

276 Gudeloglu A., Parekattil S.Yu. An update in the evaluation of the azoospermic male // Clinics. – 2013. – Vol. 68. – P. 27-34.

277 Danner S., Kajan J., Geismann S. et al. Generation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line // Mol Hum Reprod. – 2007. – Vol. 13. – P. 11-20.

278 Moreno I., Miges-Forian J.M., Simon S. Artificial gametes from stem cells // Clin Exp Reprod Med. – 2015. – Vol. 42, Issue 2. – P. 33-44.

279 Bucay N., Yebra M., Cirulli V. et al. A novel approach to obtain putative primary germ cells and Sertoli cells from human embryonic stem cells // Stem Cells. – 2009. – Vol. 27, Issue 1. – P. 68-77.

280 Nayernia K., Lee J.H., Drusenheimer N. et al. Obtaining male germ cells from bone marrow stem cells // Laboratory Invest. – 2006. – Vol. 86. – P. 654-663.

281 Sutthorpe M., Millo F. Treatment of chronic myeloid leukemia in children in 2010: the use of tyrosine kinase inhibitors and stem cell transplantation // Hematology Am Soc Hematol Educ Program. – 2010. – Vol. 2010. – P. 368-376.

282 Panahi M., Karimaghai N., Rahmanifar F. et al. Stereological evaluation of testes in busulfan-induced hamster infertility // Comp Clin Pathol. – 2014. – Vol. 24. – P. 1051-1056.

283 Ford J., Karnes K., Hess R.A. Ductuli efferentes male reproductive tract of the Syrian golden hamster // Andrology. – 2014. – Vol. 2. – P. 510-520.

284 Ilio K. Yu., Hess R.A. Structure and functions of effector ducts: a review // Microsc Res Tech. – 1994. – Vol. 29. – P. 432-467.



# ПРИЛОЖЕНИЕ А

## Авторское свидетельство

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН



**СВИДЕТЕЛЬСТВО**  
О ВНЕСЕНИИ СВЕДЕНИЙ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР  
ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ, ОХРАНЯЕМЫЕ АВТОРСКИМ ПРАВОМ  
№ 10124 от «22» мая 2020 года

Фамилия, имя, отчество, (если оно указано в документе, удостоверяющем личность) автора (авторов):  
**ЖАНКИНА РАНО АМІРХАНОВНА, ЖАНБЫРБЕКҰЛЫ УТАНБЕК, АСКАРОВ МАНАРБЕК, БАТОВИЧ**

Вид объекта авторского права: **промышленные образы**

Название объекта: **Возможности дуотрансплантации метастатических сальниковых желез в лечении мужской бесплодия**

Дата публикации объекта: **05.05.2020**



Адрес публикации: <http://www.kazpatent.kz>, <http://www.kazpatent.kz>  
"Авторское право", Белаякань, Республика Казахстан, Тел: +7 (3352) 442200/01/02/03/04

Подлинность документа авторской публикации на сайте [kazpatent.kz](http://www.kazpatent.kz)  
адресе «Авторское право» Тел: +7 (3352) 442200/01/02/03/04

Подписано ЗЦП

Куаныров Е.С.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

### Информированное согласие на участие в исследовании

Ф.И.О. пациента

Исследовательский центр: НАО «Медицинский университет Астаны»  
кафедра урологии и андрологии

Главный консультант:

Врач исследователь:

Название исследования: *«Возможности аутотрансплантации мезенхимальных стволовых клеток в лечении мужского бесплодия»*

#### *Информация для участника исследования*

Вас приглашают принять участие в научном исследовании. Перед тем, как согласиться на регистрацию, Вам необходимо ознакомиться с информацией, чтобы понять, для чего нужны данные, которые Вы предоставляете. Пожалуйста, найдите время, чтобы прочесть данный документ внимательно и решить, желаете ли Вы участвовать в этом исследовании или нет. Здесь Вы найдете ответы на вопросы, которые могут у Вас возникнуть. В конце этой формы есть согласие на участие в исследовании «Возможности аутотрансплантации мезенхимальных стволовых клеток в лечении мужского бесплодия». Если у Вас остались вопросы, Вы можете получить дополнительную информацию перед тем, как подписывать согласие.

1. Название исследования: *Возможности аутотрансплантации мезенхимальных стволовых клеток в лечении мужского бесплодия*

Бесплодие поражает примерно 15% пар репродуктивного возраста. Необструктивная азооспермия обычно считается причиной мужского бесплодия не поддающаяся медикаментозной терапии. Пациенты с необструктивной азооспермией неспособны иметь «собственных» детей и имеют только варианты применения донорской спермы или усыновления.

Терапия мезенхимальными стволовыми клетками была признана как новая опция лечения мужского бесплодия. Мезенхимальные стволовые клетки вовлечены в такие процессы как выживаемость клеток, пролиферация, миграция, ангиогенез и иммунная модуляция. Вследствие этого, данные клетки предложены как идеальный материал для регенеративной медицины.

2. Цель исследования: *Оценить эффективность и безопасность применения аутологичных костномозговых мезенхимальных стволовых клеток в лечении необструктивной азооспермии.*

Мы хотим, чтобы Вы знали, что:

- участие в этом исследовании является добровольным;
- возможно, данный метод лечения не даст положительного результата, так как является экспериментальным типом исследования;
- вы можете отказаться от участия в исследовании или выйти из него в любое время;
- у некоторых людей могут быть личные, религиозные или другие взгляды,

которые затрудняют участие в исследовании.

Если у Вас есть такие взгляды, пожалуйста, обсудите их со своим врачом или другими специалистами до того, как согласиться на участие.

### 3. Описание исследования:

Вы можете сами решить, будете ли Вы участвовать в этом исследовании или нет (это Ваш выбор). Если Вы решите принять участие в исследовании, Вас попросят заполнить, подписать и датировать данную форму информации для пациента и согласие на участие в исследовании. Вы по-прежнему сможете в любой момент отказаться от дальнейшего участия в исследовании, не объясняя причины, и Ваше решение никак не отразится на качестве Вашего дальнейшего лечения. Когда Вы согласитесь участвовать в исследовании, Ваш врач проведет клинический осмотр, в том числе, выявление жалоб, сбор анамнеза; анализ крови на гормональный статус (определение уровня общего тестостерона, ЛГ, ФСГ, эстрадиола, пролактина, ингибин В гормона), генетические анализы, анализы на онкологию, лабораторные исследования крови и мочи, пройти ультразвуковые, рентгенологические методы исследования, при необходимости магнито-резонансную томографию головного мозга, магнито-резонансную томографию позвоночника. Вам будет проведена микроскопическая биопсия яичка (microTESE) с целью обнаружения единичных сперматозоидов для последующей криоконсервации; введение в извитые каналцы яичек мезенхимальных стволовых клеток.

Подписанное согласие на исследование означает, что Вам были предложены все способы лечения необструктивной азооспермии, которые не дали положительного результата, в связи с чем Вам будет предложен новый метод лечения необструктивной азооспермии.

### 4. Условия оплаты/возможные расходы:

Оплата за лечение не предусмотрена. Осмотр пациентов будет осуществляться бесплатно. Забор костного мозга, извлечение из костного мозга мезенхимальных стволовых клеток будет осуществляться за счет средств пациента. Микроскопическая биопсия яичка (microTESE), а также введение мезенхимальных стволовых клеток в эфферентные протоки яичка будет проведена на платной основе. Проведение дополнительных лабораторных исследований будет частично осуществляться за счет медицинского страхования пациентов в рамках ГОБМП в поликлинике по месту проживания.

### 5. Предсказуемые риски и неудобства:

- при заборе костного мозга возможна аллергическая реакция на введения местных анестетиков;
- возможно наличие гематом в местах вколов пункционной иглы при заборе костного мозга;
- нарушение заживления послеоперационной раны;
- остеомиелит пунктированной кости;
- при первой попытке введения мезенхимальных стволовых клеток невозможно получение сперматозоидов;
- при введении мезенхимальных стволовых клеток есть риск онкологических процессов;



– возможно развитие послеоперационных гематом, нагноение ран, орхоэпидидимита, вплоть до орхэктомии (при microTESE).

#### 6. Ожидаемая польза:

Это исследование направлено на лечение мужского бесплодия мезенхимальными стволовыми клетками. Во время участия в исследовании Вы будете иметь пристальное медицинское наблюдение, включающее физикальный осмотр, ежедневные перевязки, анализы мочи и крови (по показаниям).

После окончания лечения контроль эффективности будет оцениваться по данным спермограмм.

Данное исследование является актуальным, результаты работ с практической точки зрения могут служить основой для применения нового терапевтического подхода для лечения необструктивной азооспермии с помощью мезенхимальных стволовых клеток. Полученные данные могут дать новые сведения о терапевтической эффективности применения мезенхимальных стволовых клеток при необструктивной азооспермии. Однако это не может быть гарантировано.

Информация, полученная в ходе данного исследования, может помочь больным с мужским бесплодием.

#### 7. Конфиденциальность:

Информация о Вашем участии в исследовании является конфиденциальной. Мы гарантируем, что Ваше имя не будет указано при публикации результатов исследования. Информация, полученная в результате этого исследования (материалы исследования), считается конфиденциальной и будет храниться в надлежащих условиях, предусмотренных законом. Однако, эти материалы исследования и Ваша личная медицинская документация могут быть доступны для проверок официальными инстанциями (Министерство здравоохранения Республики Казахстан), людьми, уполномоченными контролировать исследование или этической комиссией организации (комиссия, которая наблюдает за всеми исследованиями на людях в рамках действующих законов или инструкций).

#### 8. Добровольное участие:

Участие в данном исследовании является добровольным. Вы можете отказаться от участия в исследовании или прекратить участие в любое время. В любом случае Вам не будет отказано в том, на что Вы имеете право, не будучи участником исследования.

#### 9. Завершение участия:

Вы можете прекратить участие в исследовании в любое время без каких-либо отрицательных последствий для Вас. Отказ от участия не отразится никоим образом на отношениях к Вам вашего врача и медицинских работников.

Так же решение о прекращении участия в исследовании Вас может принять врач, если возникнут обстоятельства, которые могут принести Вам вред (аллергические реакции, выраженная негативная реакция, онкологический процесс).

#### 10. Контактные лица:

Если у Вас возникают проблемы или вопросы, касающиеся данного

исследования, Ваших прав как участника исследования или вреда от исследования, Вы можете обратиться к вашему врачу:

Лечащий врач:

Руководитель исследования:

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

### Информированное согласие пациента на проведение операции: миелоэкسفудия (забор костного мозга)

Пожалуйста, внимательно прочитайте эту информацию перед тем, как дать свое согласие на эту процедуру.

Забор костного мозга (миелоэкسفудия) выполняется в стерильных условиях операционного блока. Чаще всего эта процедура производится под местным обезболиванием 1-2% раствором новокаина и лидокаина кожи и кости, точнее надкостницы. В исключительно редких случаях (полная непереносимость препаратов для местного обезболивания) применяется внутривенный наркоз.

Забор костного мозга (100-200мл) производится через прокол кости таза с помощью специальных игл. До и после процедуры место прокола операционное поле обрабатывается йод-содержащим раствором, в конце накладывается стерильная марлевая повязка.

*Факторы риска операции и возможные послеоперационные осложнения:*

1. Реакция на введение лекарственных веществ в виде острой аллергической реакции вплоть до развития шока.

2. Кровотечение. Переливание препаратов крови и компонентов крови. Риск заражения через переливание крови: гепатит, ВИЧ и т.д. Тромбозы и тромбоэмболии, инфаркт миокарда и инсульт. Острая сердечная, дыхательная и почечная недостаточность. Отек легких:

3. Нарушение заживления послеоперационной раны.

4. Повышение артериального давления.

5. Остеомиелит пунктированной кости.

6. Нагноения в местах вколов пункционной иглы.

Я получил(а) доходчивое разъяснение о деталях и этапах операции, особенностях ближайшего послеоперационного периода. На все мои вопросы я получил(а) исчерпывающие ответы.

Я, ФИО (пациента) \_\_\_\_\_

«    » \_\_\_\_\_ «    » г.р., согласен (на) на проведение мне вышеуказанной операции, о факторах риска и возможных осложнениях и путях предупреждения осведомлен (на).

Информационное согласие получено врачом ФИО \_\_\_\_\_

Время и дата проведения информационного согласия « \_\_\_\_\_ » г.

Подпись пациента \_\_\_\_\_

Подпись врача \_\_\_\_\_