

НАО «Медицинский университет Астана»

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы Жанкиной Рано Амирхановны на тему:
«Возможности аутотрансплантации мезенхимальных стволовых клеток в
лечении мужского бесплодия», представленной на соискание степени
доктора философии (PhD) по специальности
8D10102- «Медицина»

Актуальность исследования.

Бесплодие в супружеском браке является важнейшей медико-социальной проблемой, привлекая внимание многих исследователей к проблеме репродуктивного здоровья населения [Glybochko P.V., Alyaev Yu.G., Chaly M.E. et al., 2013]. 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 V.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 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 бусульфан-индуцированной 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 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 гормона).
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:

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.

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.

Апробация работы:

Диссертационная работа прошла апробацию на расширенном заседании кафедры урологии и андрологии и кафедры хирургических болезней с курсами ангиохирургии и пластической хирургии (протокол № 10/1 от 24 июня 2022 года).

Основные результаты исследования и положения диссертации доложены на выступлениях:

- на XLIII Международной научно-практической конференции на «EurasiaScience» February 15, 2022.
- на XII Global Science and Innovations 2021: Central Asia. International Scientific Practical Journal, Nur-Sultan, Kazakhstan, February.
- на международной конференции « VII International Scientific and Practical Conference» Munich, Germany February 22 – 25, 2022
- на XVII International Multidisciplinary Conference March (Madrid, 2022).

Публикации:

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.

Результаты работы апробированы и внедрены в уроandroлогических отделениях, центрах ЭКО г.Астаны.

Личный вклад диссертанта:

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 клиничко-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.

Объем структуры и 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.