

Правительство РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

На правах рукописи

Монакова Анна Олеговна

**Эффективность и безопасность препарата на основе секрета мезенхимных
стромальных клеток человека для восстановления нарушений
сперматогенеза**

1.5.4. Биохимия

3.3.6. Фармакология и клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук, доцент, профессор РАН
Ефименко Анастасия Юрьевна
доктор фармацевтических наук, доцент
Балабаньян Вадим Юрьевич

Москва – 2026

Содержание

Список сокращений	6
Введение	9
1. Актуальность работы степень разработанности темы исследования	9
2. Степень разработанности темы исследования.....	10
3. Цель работы.....	11
4. Задачи исследования.....	11
5. Научная новизна.....	11
6. Теоретическая и практическая значимость.....	12
7. Методология и методы исследования	12
8. Положения, выносимые на защиту	13
9. Степень достоверности данных	13
10. Апробация результатов.....	14
11. Публикации.....	15
12. Личный вклад автора	15
Глава 1. Обзор литературы	16
1. Проблема идиопатического мужского бесплодия в РФ и в мире.....	16
2. Ниша сперматогониальной стволовой клетки	18
3. Патогенез мужского бесплодия и подходы к его моделированию <i>in vivo</i>	22
4. Терапевтические подходы регенеративной медицины для восстановления ниши сперматогониальной стволовой клетки.....	29
5. Роль мезенхимных стромальных клеток (МСК) в регуляции и восстановлении ниши стволовых клеток	30
6. Проблемы стандартизации препарата на основе секрета МСК.....	35
7. Регуляторный статус лекарственного препарата на основе секрета МСК.....	36
Глава 2. Материалы и методы	38
1. Получение МСК из жировой ткани человека	38
2. Получение и фракционирование секрета МСК человека.....	38
3. Концентрирование секрета МСК человека.....	38
4. Получение готовой лекарственной формы препарата на основе секрета МСК.....	39
5. Экспериментальные животные в исследовании безопасности секрета МСК	40
5.1. Оценка местной переносимости, общетоксических свойств и репродуктивной токсичности препарата на основе секрета МСК на крысах	40

5.2. Исследование репродуктивной (генеративной токсичности) на крысах...	42
5.3. Изучение иммунотоксичности препарата на основе секрета МСК на мышах	43
5.4. Исследования общетоксических свойств, местной переносимости и фармакологической безопасности препарата на основе секрета МСК на кроликах	44
5.5. Методы оценки показателей безопасности у животных	45
6. Оптимизация экспериментальной модели токсического повреждения сперматогенеза	54
7. Исследование эффективности препарата на основе секрета МСК и выбор суррогатного фактора, отражающего фармакологическую активность.....	55
7.1. Морфометрический анализ сперматозоидов	57
7.2. Гистологический анализ семенников	57
7.3. Иммуногистохимический анализ семенников	57
8. Изучение биораспределения препарата на основе секрета МСК.....	58
9. Выделение фракции, обогащенной клетками Лейдига, из семенников грызунов.....	58
10. Модель для оценки специфической активности секрета МСК <i>in vitro</i> на клетках Лейдига	59
11. Определение количества ключевых компонентов в секрете МСК.....	60
11.1. Иммуноферментный анализ	60
11.2. Оценка количества микроРНК с помощью количественной ПЦР в реальном времени.....	60
12. Вестерн блоттинг	61
13. Статистический анализ	61
Результаты	63
Глава 3. Оценка эффективности препарата на основе секрета МСК на модели токсического повреждения сперматогенеза у мышей.....	63
3.1. Валидация модели токсического повреждения сперматогенеза доксорубицином	63
3.2. Изучение ответа ниши сперматогониальной стволовой клетки на повреждение на модели токсического повреждения сперматогенеза доксорубицином	64
3.3. Исследования эффективности <i>in vivo</i> препарата на основе секрета МСК на модели токсического повреждения доксорубицином у мышей.....	66
Глава 4. Изучение механизмов действия препарата на основе секрета МСК в нише сперматогониальной стволовой клетки	70

4.1. Изучение клеточных механизмов действия препарата на основе секрета МСК <i>in vivo</i> на модели токсического повреждения сперматогенеза доксорубицином	70
4.1.1. Влияние препарата на основе секрета МСК на клетки дифферона ССК.....	70
4.1.2. Влияние препарата на основе секрета МСК на клетки Сертоли	71
4.1.3. Изучение биораспределения препарата на основе секрета МСК при локальном введении под белочную оболочку яичка в норме и при повреждении.....	72
4.1.4. Влияние препарата на основе секрета МСК на макрофаги	75
4.2. Исследование действия секрета МСК на клетки Лейдига <i>in vitro</i>	77
Глава 5. Выявление ключевых компонентов, опосредующих фармакологическую активность препарата на основе секрета МСК	79
5.1. Изучение фармакологического действия фракций секрета МСК	79
5.2. Выявление ключевых факторов, опосредующих фармакологическую активность секрета МСК <i>in vivo</i> на модели токсического повреждения сперматогенеза доксорубицином у мышей.....	80
5.3. Выявление ключевых факторов, опосредующих способность секрета МСК стимулировать секрецию тестостерона клетками Лейдига <i>in vitro</i>	82
Глава 6. Изучение безопасности препарата на основе секрета МСК.....	89
6.1. Исследование общей токсичности препарата на основе секрета МСК на грызунах	89
6.1.1. Общая токсичность при однократном локальном введении крысам под белочную оболочку яичка	89
6.1.2. Общая токсичность при многократном внутримышечном введении грызунам	89
6.1.3. Местная переносимость у крыс при локальном введении под белочную оболочку яичка	90
6.2. Исследование общей безопасности препарата на основе секрета МСК на кроликах.....	92
6.2.1. Общая токсичность при двукратном локальном введении кроликам под белочную оболочку яичка	92
6.2.2. Местная переносимость у кроликов при локальном введении под белочную оболочку яичка	93
6.3. Исследование специфических видов токсичности препарата на основе секрета МСК.....	94
6.3.1. Изучение иммунотоксичности на мышях	94
6.3.2. Репродуктивная токсичность при локальном введении под белочную оболочку яичка	95

Глава 7. Обсуждение	96
Заключение.....	102
Выводы	103
Практические рекомендации.....	105
Список цитируемой литературы.....	106
Приложения	120
Приложение 1. Результаты исследования общей токсичности препарата на основе секрета МСК на крысах	120
Приложение 2. Результаты исследования общей токсичности препарата на основе секрета МСК на кроликах	129
Приложение 3. Титульный лист брошюры исследователя	139
Приложение 4. Разрешение на проведение клинических исследований препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток человека	140

Список сокращений

- АД — артериальное давление
- АТ — антитела
- БЭК — биоэтическая комиссия
- ВВ — внеклеточные везикулы
- ВКМ — внеклеточный матрикс
- ВРТ — вспомогательные репродуктивные технологии
- ГОСТ — государственный стандарт
- ГТБ — гемато-тестикулярный барьер
- ДМЕМ — среда Игла, модифицированная Дульбекко
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДНХБ — 2,4-динитрохлорбензол
- ЕЭК — Евразийская Экономическая комиссия
- ИФА — иммуноферментный анализ
- ЛГ — лютеинизирующий гормон
- МГУ — Московский государственный университет
- МНОИ — медицинский научно-образовательный институт
- МСК — мезенхимные стромальные клетки
- РНК — рибонуклеиновая кислота
- РФ — Российская Федерация
- ССК — сперматогониальные стволовые клетки
- США — Соединенные Штаты Америки
- ТБСТ — трис-буферный раствор с добавлением детергента Твин-20
- ТД — терапевтическая доза
- ФБС — фетальная бычья сыворотка
- ФСГ — фолликулостимулирующий гормон
- ЦНС — центральная нервная система
- ЧДД — частота дыхательных движений
- ЧСС — частота сердечных сокращений

ЭКГ — электрокардиограмма

BDNF — brain-derived neurotrophic factor (нейротрофический фактор мозга)

BMP4 — bone morphogenetic protein 4 (костный морфогенетический белок 4)

CD — cluster of differentiation (кластер дифференцировки)

CHOP — комбинация препаратов ритуксимаба, циклофосфамида, доксорубицина, винкристина и преднизона

CSF-1 — colony-stimulating factor 1 (колониестимулирующий фактор 1)

CYP — цитохром P450

DAPI — 4,6-диамидино-2-фенилиндол

DES — диэтилстильбестрол

EGF — epidermal growth factor (эпидермальный фактор роста)

FGF — fibroblast growth factor (фактор роста фибробластов)

GMP — Good manufacturing practice (надлежащая производственная практика)

HGF — hepatocyte growth factor (фактор роста гепатоцитов)

IFN — интерферон

InsL3 — insulin-like 3 (инсулин-подобный белок)

ITS — insulin transferrin selenite (Инсулин-трансферрин-селенит)

Erk — extracellular signal-regulated kinase (киназа, регулируемая внеклеточными сигналами)

FDA — Food and drug administration (Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США)

FGF2 — fibroblast growth factor 2 (фактор роста фибробластов 2)

GDNF—glial cell line-derived neurotrophic factor (глиальный нейротрофический фактор)

GFP —green fluorescent protein (зелёный флуоресцирующий белок)

IGF — insulin-like growth factor (инсулиноподобный фактор роста)

IL — интерлейкин

ISCT — International Society for Cell & Gene Therapy (Международное сообщество генной и клеточной терапии)

MMP — matrix metalloproteinase (матриксная металлопротеиназа)

NF- κ B — nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (ядерный фактор активации В-клеток)

PCNA — proliferating cell nuclear antigen (пролиферирующий клеточный ядерный антиген)

PDGF — platelet-derived growth factor (тромбоцитарный фактор роста)

PEGF — placental growth factor (плацентарный фактор роста)

PCT — Patent Cooperation Treaty (договор о международной патентной кооперации)

PVDF — поливинилиденфторид

RSCI — The Russian Science Citation Index (Российский индекс научного цитирования)

SF-1 — steroidogenic factor-1 (фактор стероидогенеза-1)

StAR — steroidogenic acute regulatory protein (регуляторный белок стероидогенеза)

SMA — smooth muscle actin (гладкомышечный актин)

SOX — SRY-related HMG-box genes

Src — киназа src

TGF — transforming growth factor (трансформирующий фактор роста)

TEX — testis expressed (ген, экспрессирующийся в семенниках)

TNF — tumor necrosis factor (фактор некроза опухолей)

VEGF — Vascular endothelial growth factor (фактор роста сосудистого эндотелия)

Введение

1. Актуальность работы степень разработанности темы исследования

В России и в мире около 10–20% пар являются бесплодными, при этом примерно в половине случаев причиной является мужское бесплодие. Причины мужского бесплодия сильно различаются и могут быть связаны с врождёнными, приобретёнными или идиопатическими факторами [8, 43, 107]. В последнем случае причина неизвестна, что осложняет выбор терапии. В связи с отсутствием доказанной причины, современное лечение мужского бесплодия предполагает использование вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) или эмпирической медикаментозной терапии [70]. Основой медикаментозной эмпирической терапией являются селективные модуляторы рецепторов эстрогена (кломифена цитрат и тамоксифен), ингибиторы ароматазы (анастрозол), ингибиторы фосфодиэстеразы-5, антиоксиданты (витамин С, витамин Е, селен, цинк, CoQ10 и глутатион), однако результаты исследований по изучению эффективности данных препаратов в литературе противоречивые [22, 56]. Другие назначаемые препараты, такие как бромкриптин, альфа-адреноблокаторы, системные глюкокортикоиды, препараты магния, гонадотропин, согласно европейским рекомендациям, неэффективны в отношении лечения идиопатических случаев мужского бесплодия. В некоторых случаях экспериментально используют фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), однако мета-анализ также показал отсутствие значимого эффекта [18]. Стоит отметить, что в большинстве случаев применение перечисленных препаратов происходит в режиме off-label и не имеет сильной доказательной базы [28]. Таким образом, существующая в настоящее время терапия идиопатического мужского бесплодия является недостаточно эффективной и зачастую небезопасной, что делает поиск других эффективных терапевтических агентов актуальной задачей.

2. Степень разработанности темы исследования

В большинстве случаев мужское бесплодие связано с повреждением сперматогониальных стволовых клеток (ССК) и их специфического микроокружения, которое обеспечивает правильную регуляцию дифференцировки и функционирования стволовых клеток [115]. Ранее было показано, что использование мезенхимных стромальных клеток (МСК) и продуктов их секреции (секретомы) в модели крипторхизма у крыс способствует восстановлению ниши ССК и, как следствие, сперматогенеза и фертильности самцов [116]. При этом предполагается, что использование секретомы МСК является более безопасным по сравнению с применением МСК, поскольку предполагает меньший иммунный ответ на биологический продукт за счёт отсутствия клеточного компонента [53]. Полученные данные позволяют в перспективе предлагать биологический лекарственный препарат на основе секретомы МСК как безопасное и эффективное лекарственное средство для терапии мужского бесплодия. Однако используемая животная модель крипторхизма физиологична и зачастую обратима, что обуславливает необходимость дополнительного исследования эффективности препарата на принципиально другой модели с тяжёлыми нарушениями сперматогенеза, например, токсического генеза [115]. Для этой цели мы отработали модель токсического повреждения сперматогенеза доксорубицином и впервые изучили клеточные и молекулярные механизмы терапевтического действия секретомы МСК на этой модели.

Полученные результаты позволили установить первичную клеточную мишень препарата на основе секретомы МСК, определить вклад наиболее значимых факторов в составе секретомы МСК в его регенераторные эффекты и на основании этого разработать критичные для биологического препарата критерии для стандартизации по показателям специфической активности и подлинности.

Для дальнейшей регистрации и применения препарата на основе секретомы МСК необходимо изучить его общую и специфическую токсичность. Для решения

этой задачи были проведены исследования безопасности препарата при системном и локальном введении на грызунах и кроликах.

3. Цель работы

Исследовать эффективность и безопасность препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток человека (МСК) для восстановления сперматогенеза.

4. Задачи исследования

1. Исследовать эффективность препарата на основе секрета МСК человека на модели токсического повреждения сперматогенеза доксорубицином у мышей.
2. Выявить возможные молекулярно-клеточные механизмы, вовлечённые в реализацию фармакологического эффекта препарата на основе секрета МСК, при моделировании нарушений сперматогенеза.
3. Разработать метод биологической стандартизации препарата на основе секрета МСК.
4. Исследовать общетоксическое действие и субхроническую токсичность препарата на основе секрета МСК человека при однократном введении крысам и двукратном введении кроликам.
5. Изучить влияние на иммунную систему, репродуктивную токсичность и фармакологическую безопасность препарата на основе секрета МСК человека.

5. Научная новизна

Впервые установлена перспективность применения оригинального отечественного препарата на основе секрета МСК человека для коррекции нарушений сперматогенеза на модели токсического повреждения доксорубицином. Выявлены возможные молекулярно-клеточные мишени и механизмы, опосредующие фармакологические эффекты препарата на основе секрета МСК. Предложен метод биологической стандартизации препарата на основе секрета

МСК (новизна и практическая значимость результатов подтверждаются патентом РФ «Тест-система для оценки стимуляции секреторной активности модельных клеток терапевтическими агентами, направленными на восстановление сперматогенеза» #2825785 от 29 августа 2024 г.). Впервые выявлен вклад микроРНК-21 и VEGF в реализацию фармакологических эффектов секрета МСК. Изучены основные внутриклеточные сигнальные механизмы, опосредующие действие секрета МСК на клетках Лейдига *in vitro*. Впервые исследован профиль безопасности влияния препарата на основе секрета МСК человека на нескольких видах животных.

6. Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты углубляют понимание регенераторных механизмов МСК в повреждённой нише ССК, реализуемых за счёт действия секрета клеток. Продемонстрирована возможность фармакологической коррекции нарушений сперматогенеза с использованием секрета МСК. Предложена и валидирована оригинальная модель для биологической стандартизации препарата на основе секрета МСК по показателю специфической активности. Установлено, что препарат на основе секрета МСК человека обладает благоприятным профилем безопасности и рекомендован для дальнейшего клинического изучения.

Полученные в диссертации результаты были использованы при подготовке комплекта документов, поданного в Министерство здравоохранения РФ, на проведение регистрационных клинических исследований препарата на основе секрета МСК для лечения мужского бесплодия, по итогам экспертизы которых было получено разрешение на клинические исследования I/II фазы (№328 от 14 августа 2024 г.)

7. Методология и методы исследования

Регуляторные исследования выполнены в соответствии с принципами GLP OECD (ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики») и

Решением Совета ЕЭК №81 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» от 03.11.2016 г.

В ходе выполнения данной диссертационной работы применены следующие методы: биохимические (иммуноферментный анализ, вестерн блоттинг, ингибиторный анализ), молекулярно-биологические (полимеразная цепная реакция), цитологические (выделение и культивирование клеток, клеточные модели оценки специфической активности секрета МСК), физиологические (животные модели для оценки эффективности, безопасности и биораспределения), гистологические методы (гистохимический и иммуногистохимический анализ, морфометрия) и релевантные статистические методы обработки данных.

8. Положения, выносимые на защиту

1. Препарат на основе секрета МСК человека способен восстанавливать нарушения сперматогенеза, вызванные доксорубицином в эксперименте.
2. Эффекты секрета МСК реализуются главным образом за счёт воздействия на клетки Лейдига.
3. В реализации эффектов секрета МСК вовлечены VEGF и микро-РНК-21, содержащиеся в секрете.
4. Для биологической стандартизации препарата может быть использована способность секрета МСК стимулировать секрецию тестостерона клетками Лейдига.
5. Препарат на основе секрета МСК человека обладает приемлемым профилем безопасности в доклинических токсикологических исследованиях.

9. Степень достоверности данных

Научные результаты диссертационной работы обладают высокой степенью достоверности. Для проверки гипотез были проведены серии независимых научных экспериментов, включающие в себя необходимое число повторов экспериментальных точек и достаточное количество экспериментальных животных.

Статистическая обработка результатов измерений проводилась с использованием программы GraphPad Prism 10.

10. Апробация результатов

Работа выполнялась в рамках проектов государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова «Фармацевтическая разработка, доклиническое и клиническое исследования лекарственного препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека для лечения мужского бесплодия», государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова № 0908 «Поиск терапевтических мишеней, разработка инновационных препаратов и тканеинженерных конструкций», РФФИ № 19-75-30007-П «Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека».

Результаты диссертационной работы представлены на Молодёжной школе-конференции молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, (2020 и 2022), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, (2020, 2021, 2022, 2023), 24th Symposium of Biology Students in Europe, онлайн, Португалия, 2021 (на английском языке), XXI Конгрессе Российского общества урологов, онлайн, Россия, 2021, ISSCR International Symposium “Stem Cells: from Genes to Organs”, онлайн, Израиль, 2022 (на английском языке), ISCOMS, онлайн, Нидерланды, 2022 (на английском языке), Национальном конгрессе по регенеративной медицине, Россия, (2022 и 2024), Student Conference Life Sciences in the 21st Century: Looking into the Future, Москва, 2022 (на английском языке), Конгрессе “CRISPR-2023”, Новосибирск, 2023, Международном конгрессе по фундаментальной и клинической урологии и онкоурологии, Уфа, 2024, FEBS, Милан, Италия, 2024 (на английском языке), IX Всероссийском молодёжном научном форуме «Наука будущего — наука молодых», Самара, 2024.

Доклады конференций трижды признавались лучшими на XXIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных

«Ломоносов» в секции «Регенеративная медицина», 2022, Student Conference Life Sciences in the 21st Century: Looking into the Future, Москва, 2022 и IX Всероссийском молодёжном научном форуме «Наука будущего — наука молодых», 2024.

11. Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 публикаций, индексируемых Scopus, Web of Science, RSCI, ВАК. По результатам исследования опубликован патент Российской Федерации «Тест-система для оценки стимуляции секреторной активности модельных клеток терапевтическими агентами, направленными на восстановление сперматогенеза» #2825785 от 29 августа 2024 г.

12. Личный вклад автора

Автору диссертационного исследования принадлежит ключевая роль в постановке целей и формулировке задач, планировании проведении экспериментов, статистической обработке результатов. Написание текста диссертации, тезисов, публикаций и патентной заявки автор выполнял лично.

Глава 1. Обзор литературы

1. Проблема идиопатического мужского бесплодия в РФ и в мире

Мужское бесплодие в 50% случаев является причиной бесплодности семейных пар во всём мире. Причины мужского бесплодия могут быть связаны с врождёнными, приобретёнными или идиопатическими факторами [8, 43, 107]. К врождённым факторам чаще всего относят генетические изменения: хромосомные аномалии, микроделеции Y-хромосомы, синдром Каллмана [8]. Существуют исследования, показывающие вовлечённость многих генов в развитие мужского бесплодия [137]. Среди приобретённых причин выделяют варикоцеле, опухоли, системные заболевания, противоопухолевую терапию, травмы яичка и другие. Около 30–50% всех случаев мужского бесплодия являются идиопатическими, в которых причина бесплодия не установлена [8]. В связи с этим в мире активно ведутся работы по изучению патогенеза идиопатического мужского бесплодия.

Около 10% мужчин с необструктивной азооспермией (НОА) демонстрируют повышенную частоту неудачных рекомбинаций. Для правильной мейотической рекомбинации необходим целый комплекс факторов, в том числе TEX11 [128]. TEX11 представляет собой специфичный для зародышевой клетки ген, расположенный в X-хромосоме и кодирующий белок, который регулирует конъюгацию гомологичных хромосом и репарацию двухцепочечных разрывов ДНК [153]. Мутации TEX11 были обнаружены у 2,4% мужчин с идиопатическим бесплодием и приводили к апоптозу сперматоцитов, задержке созревания и азооспермии [91]. Также известны единичные исследования по изучению возможных причин идиопатического мужского бесплодия, связанных с модификациями гистонов, микроРНК и оксидативным стрессом, однако первопричина таких изменений требует дальнейшего изучения [115].

Поскольку зачастую определить причину не удаётся, современное лечение мужского бесплодия предполагает использование вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) или эмпирически подобранной медикаментозной терапии. ВРТ применяется при наличии нормальных

сперматозоидов и включает экстракорпоральное оплодотворение, либо интрацитоплазматическую инъекцию [70]. Одним из методов сохранения сперматозоидов для этого является своевременная криоконсервация сперматозоидов, например, перед курсом химиотерапии.

Основой медикаментозной эмпирической терапии являются селективные модуляторы рецепторов эстрогена (кломифена цитрат и тамоксифен), которые специфически связываются с эстрогенными рецепторами, что приводит к увеличению секреции гонадотропинов по механизму обратной связи и гормональной стимуляции сперматогенеза. Ещё одной терапевтической группой препаратов, которые применяются для лечения мужского бесплодия, являются ингибиторы ароматазы, в частности, анастрозол. Механизм действия анастрозола заключается в ингибировании фермента ароматазы, который отвечает за превращение андрогенов в эстрогены. Некоторые исследования показали улучшение качества сперматозоидов при приёме ингибиторов фосфодиэстеразы-5. У 80% мужчин с мужским бесплодием наблюдается повышение окислительно-восстановительного потенциала в семенной жидкости, что является ещё одной возможностью для подбора терапии. В результате в терапии часто используют антиоксиданты: витамин С, витамин Е, селен, цинк, CoQ10 и глутатион, и их комбинации, однако исследования по изучению их эффективности в литературе противоречивы, что требует дальнейшего изучения. Бромкриптин, альфа-адреноблокаторы, системные глюкокортикоиды, препараты магния, гонадотропин также применяются, однако в соответствии с Европейскими рекомендациями являются неэффективными в отношении лечения идиопатических случаев мужского бесплодия. В некоторых случаях экспериментально используют фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), однако мета-анализ показал отсутствие значимого эффекта [18]. Стоит отметить, что в большинстве случаев применение перечисленных препаратов происходит в режиме off-label и не имеет сильной доказательной базы [28].

Таким образом, сложность подбора терапии может заключаться в недостаточных научных данных в области патогенеза идиопатического мужского

бесплодия и отсутствия возможных перспективных субстанций, что делает поиск новых эффективных и безопасных терапевтических агентов актуальной задачей [75].

2. Ниша сперматогониальной стволовой клетки

На протяжении всей жизни клеточные компоненты тканей и органов нуждаются в своевременном обновлении. В большинстве случаев обновление может происходить за счёт пролиферации терминально дифференцированных клеток или за счёт стволовых клеток и клеток-предшественников, которые присутствуют во взрослом организме [59]. Активность стволовых клеток и клеток-предшественников регулируется нишей, которая представляет собой микроокружение со сложным комплексом паракринных, метаболических, физических и химических взаимодействий [64, 123]. Такую тонкую регуляцию обеспечивают поддерживающие клетки, сигнальные молекулы, факторы роста, компоненты внеклеточного матрикса, внеклеточные везикулы и системные сигналы.

В нише ССК можно выделить две основные структурные единицы: семенные каналцы и интерстициальное пространство между каналцами (рис. 1). В семенных каналцах происходит процесс сперматогенеза, который включает в себя множество промежуточных процессов, завершающихся образованием из сперматогониальных стволовых клеток зрелых мужских гамет — сперматозоидов. Сперматогенез включает следующие этапы: пролиферация сперматогониев, сперматогониальная дифференцировка в сперматоциты; мейотическое деление сперматоцитов с образованием сперматид; созревание круглых сперматид и затем выход зрелых сперматозоидов в просвет семенного каналца. Помимо сперматогониальных стволовых клеток основными компонентами семенных каналцев являются базальная мембрана, перитубулярные миоидные клетки и клетки Сертоли [41].

Клетки Сертоли образуют между собой плотные контакты, которые вместе с базальной мембраной являются основой для гемато-тестикулярного барьера (ГТБ). Первыми клетками дифферона, которые находятся под ГТБ, являются первичные сперматоциты. Такой барьер необходим для защиты иммунопривилегированной зоны внутри канальцев и избежания ответа иммунной системы на более дифференцированные клетки сперматогенеза [93]. Клетки Сертоли принимают участие в иммуносупрессии, а также обеспечивают проникновение только необходимых веществ внутрь семенных канальцев, в то время как остальные вещества «выбрасываются» наружу [91]. Кроме того, клетки Сертоли необходимы для поддержания жизнеспособности и регуляции дифференцировки ССК и сразу нескольких слоёв дифферона, в связи с чем клетки Сертоли имеют изменчивую ветвистую морфологию [63]. Такое тесное взаимодействие обеспечивает выработку ингибина В — фактора, регулирующего продукцию и секрецию фолликулостимулирующего гормона (ФСГ). ФСГ выделяется гипофизом и, действуя на несколько мишеней клеток яичка, активирует сперматогенез. Кроме того, клетки Сертоли выделяют ряд факторов роста, которые регулируют поведение непосредственно стволовых клеток. Так, GDNF поддерживает самообновление ССК и ингибирует их дифференцировку. CXCL12/CXCR4, FGF и VEGF-A действуют синергически с GDNF для поддержания стволовости ССК [35, 38]. Напротив, ретиноевая кислота — гормон, секретлируемый главным образом клетками Сертоли, играет незаменимую роль в индукции дифференцировки ССК с помощью подавления экспрессии GDNF и активации факторов, способствующих дифференцировке, таких как BMP и SCF [41]. Также клетки Сертоли продуцируют лактат — один из основных источников энергии для некоторых клеток дифферона [109]. Кроме того, клетки Сертоли обладают фагоцитарной функцией и “очищают” семенной каналец от погибших клеток дифферона [91].

Перитубулярные миоидные клетки окружают семенные канальцы и вместе с клетками Сертоли участвуют в образовании ГТБ [87]. Ещё одной важнейшей функцией перитубулярных миоидных клеток является продвижение тестикулярной жидкости с помощью сократительных нитей актина и миозина. Перитубулярные

миоидные клетки также продуцируют ростовые факторы CSF1 и GDNF, необходимые для регуляции стволовых клеток [105].

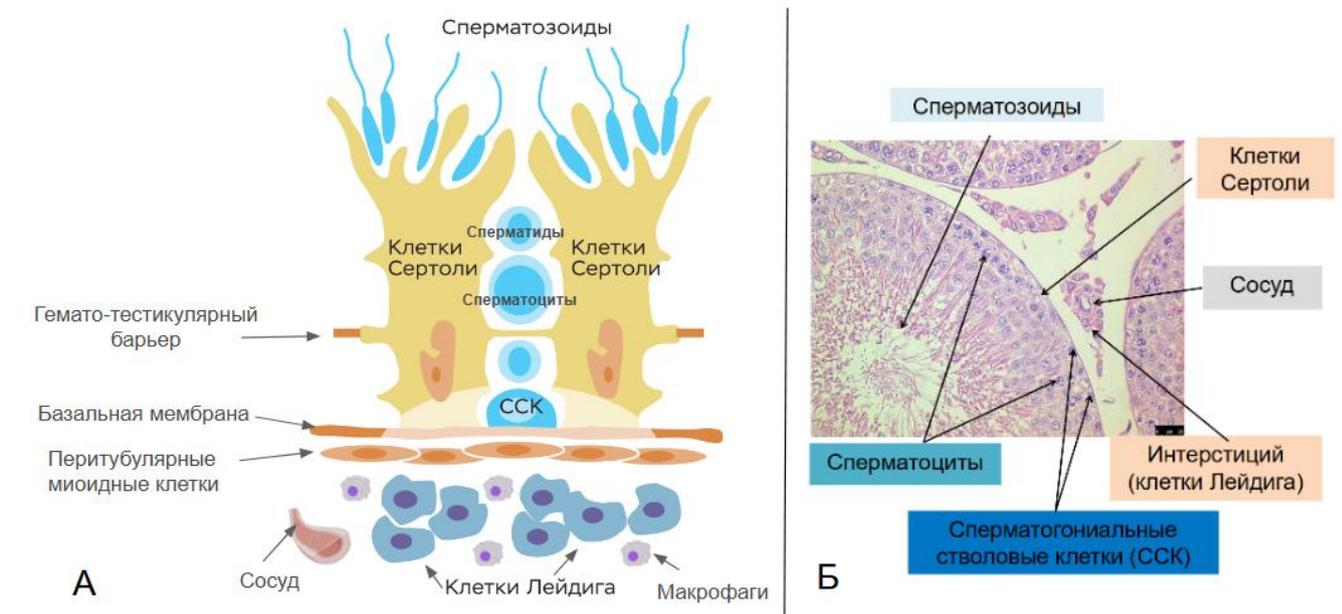


Рис. 1. А. Строение ниши сперматогиональной стволовой клетки. Адаптировано из статьи Hofmann 2022. Б. Гистологический срез семенника. Окраска гематоксилином и эозином.

Окружающее семенные канальцы интерстициальное пространство включает главным образом клетки Лейдига (около 80%), в меньшей степени — мезенхимные и иммунные клетки. Клетки Лейдига отвечают, главным образом, за стероидогенез, в частности синтез тестостерона [112]. Одним из главных регуляторов функционирования клеток Лейдига является лютеинизирующий гормон (ЛГ). Связывание ЛГ с рецепторами на клетках Лейдига стимулирует выработку цАМФ, увеличивая скорость перемещения холестерина в митохондрии [103]. Холестерин метаболизируется до прегненолона ферментом СYP11A1 на внутренней мембране митохондрий, а прегненолон — до тестостерона внутри митохондрий в результате цепочки ферментативных реакций [13] (рис. 2). Синтезированные стероидные гормоны могут храниться во внутритестикулярном компартменте или высвободиться в системный кровоток [41].

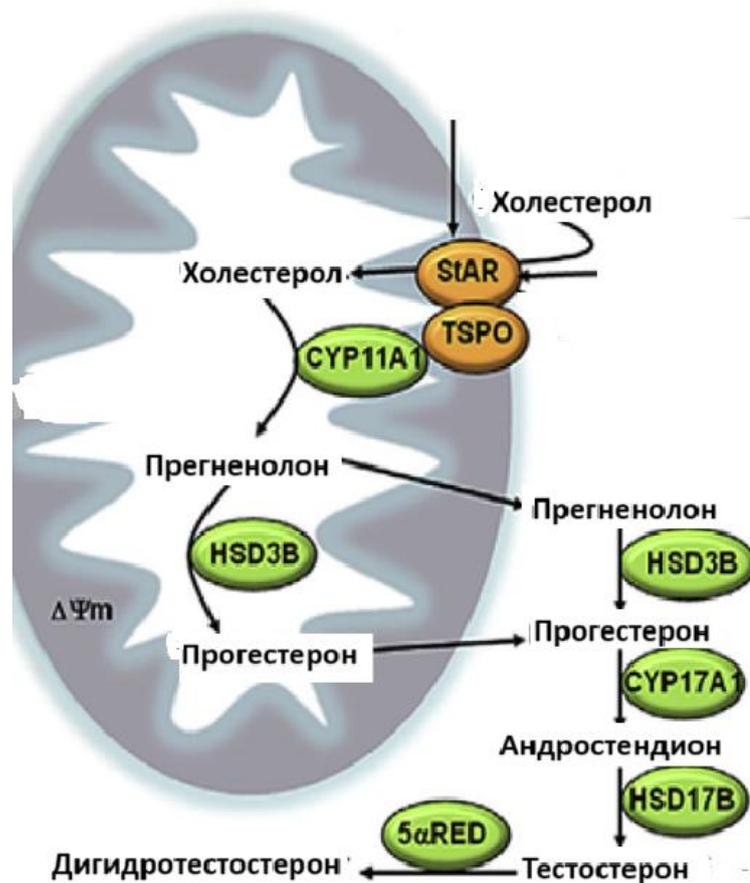


Рис. 2. Биосинтез тестостерона в клетках Лейдига. Клетки Лейдига синтезируют андроген тестостерон из холестерина с помощью множества участников, включающих транспортеры холестерина, стероидогенные ферменты и множество регуляторных молекул. Критичные стадии синтеза тестостерона проходят в митохондрии, последние этапы синтеза — в цитоплазме клеток Лейдига. Адаптировано из статьи Andric, 2019.

Локально стероидные гормоны необходимы для поддержания гематотестикулярного барьера, мейоза сперматоцитов, адгезии сперматид к клеткам Сертоли и высвобождения сперматозоидов в просвет семенных канальцев [127]. Другим гормоном, секретиремым клетками Лейдига, является окситоцин [96]. Окситоцин действует на перитубулярные миоидные клетки, усиливая сокращения семенных канальцев, а также может действовать аутокринно, стимулируя стероидогенез [73]. Кроме того клетки Лейдига секретируют ряд паракринных факторов, например, IGF-1, который стимулирует пролиферацию ССК, а также аутокринно влияет на клетки Лейдига [49, 142].

Иммунные клетки в интерстициальном пространстве необходимы для защиты от патогенов и поддержания иммунопривилегированности семенных канальцев. Такая защита от иммунных реакций, формируемая поддерживающими клетками ниши, критически важна для сохранения дифферона ССК, поскольку сперматогенез начинается во время полового созревания — гораздо позже, чем формирование иммунной системы. Среди иммунных клеток яичка можно выделить макрофаги, Т-лимфоциты, в меньшей степени тучные и дендритные клетки, которые выделяют противовоспалительные факторы, например, IL-10 и TNF-а [21, 30].

В интерстициальном пространстве также найдены МСК, которые являются значимыми регуляторами гомеостаза и регенерации в нишах стволовых клеток. Однако про резидентные МСК в нише ССК в настоящее время мало данных.

Таким образом, за регуляцию функций ССК и стероидогенез отвечают множество поддерживающих клеток, паракринных и системных сигналов, образующих нишу ССК. Нарушение звеньев ниши может приводить к нарушению баланса, и, как следствие, к нарушению функциональности ткани и сперматогенеза.

3. Патогенез мужского бесплодия и подходы к его моделированию *in vivo*

Физиологическим обратимым нарушением сперматогенеза является крипторхизм — неопущение яичка в мошонку. Для некоторых животных с сезонным размножением такое состояние является вариантом нормы, при котором опущение яичек происходит только в период размножения. Однако в большинстве случаев, в том числе у человека, крипторхизм является заболеванием. До сих пор неизвестна однозначная причина развития крипторхизма. Существует ряд гипотез, связанных с влиянием генетических факторов и факторов окружающей среды. Одна из гипотез заключается в том, что крипторхизм может развиваться из-за гормональных нарушений у плода [77]. Опущение яичка происходит в две фазы, контролируемые гормонами, выделяемыми клетками Лейдига: инсулиноподобным пептидом 3 (INSL3) и тестостероном. Нарушения продукции/действия андрогенов у плода или подавление INSL3 могут приводить к развитию крипторхизма у

грызунов. У людей пренатальное воздействие сильнодействующего эстрогена диэтилстильбестрола (DES) было связано с последующим повышенным риском крипторхизма у ребёнка [139]. В любом случае, причиной нарушения сперматогенеза при крипторхизме является высокая температура в брюшной полости (37 °С) по сравнению с физиологической для яичек температурой (35 °С), что приводит к повышению проницаемости ГТБ, снижению жизнеспособности стволовых клеток и клеток Сертоли, а также увеличению количества интерстициальных клеток — макрофагов и клеток Лейдига [139].

Другими причинами повреждения сперматогенеза могут быть токсические факторы, например приём химиотерапевтических лекарственных препаратов. Некоторые из них, например, алкилирующие препараты, препараты на основе платины, алкалоиды барвинка, антиметаболиты и ингибиторы топоизомеразы могут критично повреждать сперматогенез [95]. В таблице 1 представлено влияние основных химиотерапевтических препаратов на поддерживающие клетки ниши ССК.

Таблица 1. Действие химиотерапевтических препаратов из разных групп на клетки ниши сперматогониальной стволовой клетки.

Класс	Препарат	Механизм действия	Влияние на ССК	Влияние на клетки Сертоли	Влияние на клетки Лейдига	Обратимость повреждения	Ссылки
Интеркалирующие препараты	Доксорубин	1) Ингибирование процессов транскрипции и репликации вследствие встраивания доксорубина между цепями ДНК. 2) Нарушение работы топоизомеразы 2 типа. 3) Индукция окислительного стресса	++ Ингибирование клеточного цикла на стадии G2/M, что приводит к апоптозу сперматоцитов	+ Снижение числа клеток Сертоли	+ Ингибирование клеточного цикла на стадии G2/M	Обратимое	[131, 132]
Алкилирующие агента Соединения платины	Цисплатин	1) Формирование поперечных сшивок между цепями ДНК. 2) Присоединение алкильных групп к азотистым основаниям ДНК, что приводит к активации системы репарации и разрушению ДНК. 3) Мутации нуклеотидов вследствие разъединения нуклеотидных пар.	+++	+ Повышение уровня экспрессии GDNF	Неизвестно	Обратимое	[10, 67, 124]
Алкилирующие агенты	Циклофосфамид	Алкилирование белков, поддерживающих двойную структуру ДНК, что	++ Повреждение структуры хроматина.	+ Повреждение цитоскелета, окислительный	+ Атрофия клеток Лейдига.	Необратимо в комбинации (СНОР)	[24, 58, 65]

Производные азотистого иприта		приводит к разрушению ДНК и гибели клетки.	Клетки также подвергаются окислительному стрессу за счёт образования метаболита циклофосфомид а — акролеина.	стресс приводят к снижению жизнеспособности клеток Сертоли.	Циклофосфамид приводит к значимому снижению тестостерона в плазме крови животных.		
	Хлорамбуцил		+ Наиболее подвержены клетки с мейотическим делением, в меньшей степени ранние сперматиды и зрелые сперматозоиды.	-	+ Повышение уровня лютеинизирующего гормона в плазме крови животных.	Обратимое	[15, 55]
	Мелфалан		++ Доминантные летальные мутации на постмейотических стадиях и цитотоксичность на стадии стволовых клеток и ранних сперматид	-	-		[11, 55]

	Изофламид		+ Доминантные мутации в сперматозоидах, сперматиде и сперматоцитах.	-	-		[145]
Алкилирующие агенты Производные нитрозомочевин	Кармустин	1) Алкилирование и формирование поперечных сшивок в ДНК. 2) Модификация редуктазы глутатиона, что может приводить к клеточной смерти	+				
Алкилирующие агенты Производные сульфонов	Бусульфан	Алкилирование и формирование поперечных сшивок в ДНК преимущественно в фазе деления G0/G1	+ Апоптоз клеток	+ Изменение экспрессии факторов клеток Сертоли GDNF, BMP4, а также компонентов ГТБ	-	Обратимое	[12, 27]
Антиметаболиты	Цитарабин	Антиметаболиты встраиваются в ДНК в синтетический период, маскируясь под пурины и пиримидины. Цитарабин метаболизируется до активной фосфорилированной формы. Этот метаболит помимо встраивания в ДНК ингибирует альфа-ДНК-	++	+	Неизвестно	Неизвестно	[90]

		полимеразу, бета-полимеразу, тем самым нарушая процессы репарации					
Алкалоиды барвинка	Винбластин	Взаимодействие с тубулином и повреждение микротрубочек, в том числе во время формирования веретена деления, что вызывает остановку метафазы	+	+	-	Обратимое	[24, 83, 86]
	Винкристин		+	?	+		[82]
Ингибиторы топоизомеразы II Подофиллотоксины	Этопозид	Этопозид в фазах S и G2 ингибирует топоизомеразу II, ингибируя сшивание ДНК после разрыва. Это приводит к возникновению ошибок процессов с ДНК и апоптозу клеток	+ Снижение числа сперматогониев и сперматоцитов	+ Снижение продукции трансферрина клетками Сертоли	+ Гиперплазия клеток Лейдига и ингибирование транскрипции генов, кодирующих ферменты синтеза стероидных гормонов	Необратимо	[40, 81, 83]

Из таблицы 1 видно, что многие химиотерапевтические агенты влияют на активно делящиеся ССК. Некоторые препараты, такие как бусульфан и доксорубин, повреждают основные поддерживающие клетки — клетки Лейдига и клетки Сертоли. Такие химиотерапевтические препараты, комплексно повреждающие нишу ССК, могут использоваться для создания моделей мужского бесплодия на животных и доклинических исследований препаратов для лечения мужского бесплодия. Преимуществом доксорубина для данных целей является широкий терапевтический интервал и дозозависимость повреждения. Основным механизмом действия доксорубина связан с интеркаляцией молекулы между цепями ДНК, что приводит к нарушению матричных процессов. Доксорубин также может вызывать гибель клеток или остановку роста клеток путем ингибирования топоизомеразы II. Ингибирование топоизомеразы II приводит к нарушению лигирования ДНК после репликации, а следовательно, к фрагментации хромосом с последующей анеуплоидией образующихся в результате мейоза сперматид. Кроме того, доксорубин инициирует продукцию активных форм кислорода, что приводит к окислению клеточной и митохондриальной ДНК, а затем к повреждению и клеточной гибели [111, 135]. Под воздействием доксорубина в ССК наблюдали повышенную экспрессию CDKN1a — белка, который способствует остановке клеточного цикла и ингибированию генов белков, участвующих в репарации ДНК [17]. Доксорубин изменяет профили миРНК в ССК, клетках Лейдига и клетках Сертоли [9].

Таким образом, при повреждениях ниши ССК разного генеза чаще нарушается функционирование одновременно нескольких мишеней. Однако для идиопатического мужского бесплодия природа неизвестна, поэтому наиболее релевантной для доклинических исследований моделью на животных может быть модель, в которой наблюдается комплексное повреждение всех основных компонентов ниши ССК. С этой точки зрения подходит повреждение сперматогенеза с помощью доксорубина.

4. Терапевтические подходы регенеративной медицины для восстановления ниши сперматогониальной стволовой клетки

Стратегия успешных методов лечения заболеваний, связанных с повреждением ниши, может быть направлена на замещение компонентов ниши, например стволовых или поддерживающих клеток, либо на стимуляцию эндогенных механизмов организма. Регенеративная медицина объединяет оба подхода и позволяет восстановить утраченные функции с помощью клеточной, тканевой и генной терапии [32].

Поскольку в ряде случаев мутации в генах могут быть основной причиной мужского бесплодия, ряд авторов исследуют возможность генной модификации [137]. Было показано, что *in vivo* введение лентивируса или аденовируса с функциональным геном Kit-лиганда в клетки Сертоли может восстановить сперматогенез у мышей, у которых присутствует мутация в гене Kit-лиганда. При этом введённый ген не передавался потомству, что говорит об относительной безопасности. У человека мутации в гене Kit-лиганда не вызывают бесплодия, зато известен ряд мутаций в генах зародышевых клеток, например, *SOHLH1* и *TEX11*, и в соматических клетках, например, ген андрогенного рецептора или *NR5A1*, которые вносят вклад в развитие мужского бесплодия и могут быть мишенью генной терапии [54]. Тактика генной терапии направлена на восстановление только одной мишени, что в условиях комплексного повреждения может быть неэффективно.

Примером клеточной терапии, направленной на лечение мужского бесплодия, являются различные варианты аутогенной трансплантации ССК, приводящие к восстановлению сперматогенеза и фертильности [64]. В случаях, когда повреждены не только ССК, но и соматические клетки, рассматривают варианты совместной трансплантации разных типов клеток [106]. Ещё одним экспериментальным подходом является заморозка тканей яичек с последующей трансплантацией реципиенту. В 2012 году опыты по аутологичной и аллогенной трансплантации ССК у бесплодных резус-макак показали восстановление сперматогенеза и продукцию функциональных сперматозоидов [64]. Известно

лишь одно клиническое испытание в 2000 году, в котором аутологично вводили ССК, полученные у пациента до курса химиотерапии. Результаты этого исследования не были опубликованы [108].

В случаях отсутствия ССК возможен другой экспериментальный подход, при котором используют индуцированные плюрипотентные стволовые клетки или эмбриональные стволовые клетки для их дифференцировки в ССК с последующим введением пациенту [92]. Однако из-за больших рисков, связанных с использованием стволовых клеток и ряда этических вопросов, данные подходы не используются в клинической практике [88, 143]. При мужском бесплодии помимо повреждения ССК зачастую наблюдают нарушение функционирования ниши ССК целиком. По этой причине пересадка здоровых клеток в повреждённое микроокружение может быть неэффективной из-за гибели введённых клеток. Кроме того, в условиях неадекватной регуляции ниши возможен риск злокачественной трансформации клеток, что делает терапию небезопасной [152].

Таким образом, перспективным фармакологическим агентом для восстановления сперматогенеза может быть бесклеточный препарат с плейотропным действием, который действует на множество мишеней ниши ССК, восстанавливая нишу и функцию органа.

5. Роль мезенхимных стромальных клеток (МСК) в регуляции и восстановлении ниши стволовых клеток

Регенераторными свойствами для лечения заболеваний, связанных с повреждением ниши стволовых клеток, обладают мультипотентные МСК. Эти клетки поддерживают структуру тканей и их способность к обновлению и регенерации на протяжении всей жизни. В 2005 г. международное общество клеточной терапии (ISCT) предложило для этих клеток термин «мультипотентные мезенхимные стромальные клетки». Критерии, согласно которым выделенные в культуру клетки могли быть отнесены к МСК, включают: 1) адгезию к пластику; 2) экспрессию маркёров CD73, CD90 и CD105; 3) отсутствие маркёров CD14, CD11b,

CD34, CD19, CD79a, CD45, и HLA-DR; 4) способность МСК к дифференцировке в линии адипоцитов, хондроцитов и остеобластов [140].

МСК важны для функционирования ниш стволовых клеток, а также могут играть ключевую роль в регенерации и восстановлении функции ткани. МСК могут оказывать свои эффекты за счёт прямой дифференцировки в другие типы клеток, в том числе в канонические направления — адипоциты, хондроциты и остеобласты. Этот процесс очень важен при заживлении переломов кости, поскольку хондроциты и остеобласты играют в нём основную роль. Кроме того, хондроциты выделяют внеклеточный матрикс, который затем способствует процессу окостенения [71]. Таким образом, МСК участвуют в процессах прямого и непрямого остеогенеза [85].

Другим регенераторным механизмом может быть эффероцитоз, в процессе которого МСК поглощаются макрофагами и изменяют их фенотип на противовоспалительный [51, 99]. Макрофаги являются важнейшим партнером МСК в различных тканеспецифичных нишах, взаимодействуя также посредством межклеточных контактов, переноса органелл и секреции ряда растворимых факторов [97], [80]. Известно, что макрофаги часто являются необходимыми участниками для реализации регенераторного потенциала МСК. Элиминация макрофагов в моделях повреждения легких, кишечника, почках, кожи значительно снижает положительный эффект экзогенного введения секрета МСК [52, 61, 146].

В настоящее время общепризнана важность паракринных эффектов МСК, в частности секреции цитокинов, факторов роста, компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), внеклеточных везикул (ВВ) и переноса органелл в клетки-мишени, которые защищают ткани от повреждений, регулируют реакцию стволовых клеток и их микроокружения [117].

Среди факторов, секретируемых МСК, можно выделить сотни молекул, влияющих на ангиогенез (IL-6, IL-8; VEGF и др.), нейрогенез (Т-кадгерин; нейропиплин-1; BDNF и др.), иммунный ответ (CCL2; CXCL-3, G-CSF; IL-6 и др.) и регулирующих функцию стволовых и специфических поддерживающих клеток ниши [69].

Важнейшим продуктом секреции МСК являются внеклеточные везикулы (ВВ) [42]. Международное общество определяет внеклеточные везикулы как частицы, естественным образом высвобождаемые из клетки, которые ограничены липидным бислоем и не могут реплицироваться, т. е. не содержат функционального ядра [133] (рис. 3А). Билипидная мембрана внеклеточных везикул содержит на поверхности специфичные рецепторы и факторы активации иммунных клеток, а внутри везикул находятся ферменты, цитокины, хемокины, факторы роста, ДНК, мРНК, микроРНК [34, 44] (рис. 3В). Особую роль могут играть везикулярные микроРНК — некодирующие малые регуляторные РНК, способные регулировать трансляцию мРНК путем запуска деградации таргетной мРНК или подавления ее трансляции в клетках-мишенях [113] (рис. 3А).

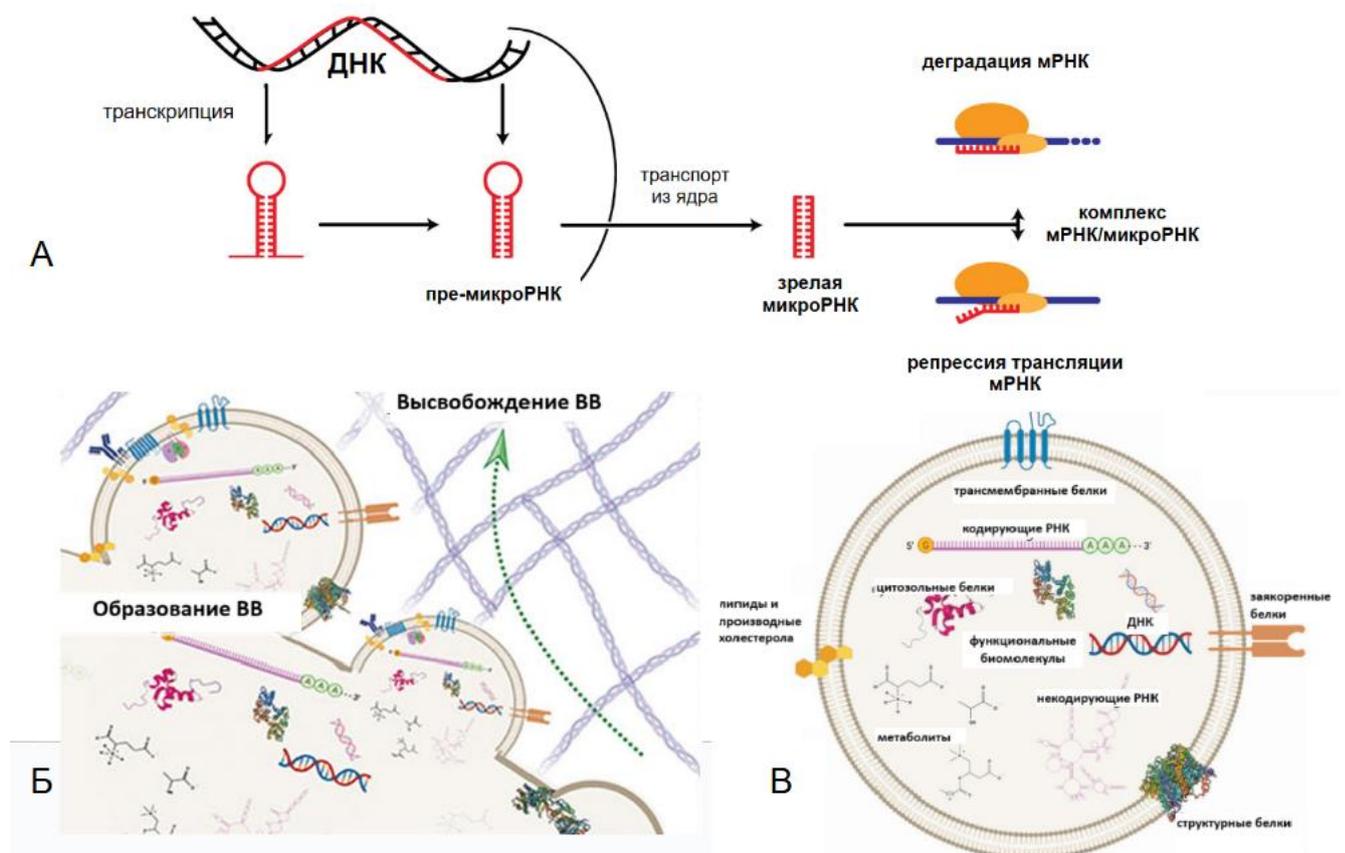


Рис. 3. А. Биогенез микроРНК состоит из трех основных процессов: транскрипции длинного первичного транскрипта, за которым следуют два последовательных расщепления, инициируемых ферментами РНКазы III Дроша и Дайсер, в результате чего образуется зрелая микроРНК. Механизм, реализуемый микроРНК, заключается в деградации мРНК в случае комплементарного узнавания, либо в

репрессии трансляции мРНК в случае частичного узнавания. Б. Биогенез внеклеточных везикул (ВВ). В. Состав внеклеточных везикул (ВВ). Бислой мембраны состоит из производных фосфолипидов и холестерина. Внутри ВВ могут содержаться метаболиты, малые молекулы, ДНК и РНК (как кодирующие, так и некодирующие). Белки могут быть растворимыми, ассоциированными с мембраной, закрепленными на мембране и трансмембранными. Адаптировано из статьи Ryan, 2015.

За счёт секреции множества компонентов с разнонаправленным действием МСК являются многообещающими объектами в области регенеративной медицины для лечения заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной, костно-мышечной, нервной системы [14, 57, 89].

Некоторые факторы, секретируемые МСК, участвуют в регуляции ниши ССК. Так, GDNF вносит вклад в самообновление ССК [100]. Колониестимулирующий фактор-1 (CSF-1) стимулирует пролиферацию и дифференцировку ССК [122]. c-kit лиганд защищает ССК от апоптоза и стимулирует стероидогенез в клетках Лейдига [48].

FGF5, PDGF и EGF стимулируют пролиферацию ССК [110, 134]. IGF-1 обладает антиапоптотическим действием на клетки Лейдига и поддерживает плюрипотентность ССК [33, 66, 126, 151]. FGF9, EGF и VEGF стимулируют стероидогенез в клетках Лейдига [79, 138]. HGF повышает секрецию uPA и MMP2 и уменьшает секрецию фибронектина клетками Лейдига [26].

Приведённые эффекты факторов роста реализуются, как правило, после специфического связывания с рецептором с тирозинкиназной активностью, что индуцирует димеризацию рецептора. Однако димеризация может происходить даже в отсутствие активирующего лиганда. Например, инсулиновый рецептор и IGF1-рецептор экспрессируются на клеточной поверхности в виде димеров $(\alpha\beta)_2$, соединённых дисульфидной связью, а под воздействием лиганда претерпевают структурные изменения, что приводит к аутофосфорилированию. Образовавшиеся фосфорилированные остатки тирозинов функционируют как специфические сайты для сборки нижестоящих сигнальных молекул с SH2 и РТВ доменами, которые рекрутируются к фосфорилированным остаткам тирозина и активируются в ответ

на стимуляцию фактором роста [78]. В результате могут активироваться набор путей, характерные для конкретного фактора роста: Ras/raf/МКК1/2, Akt, FAK, ERK1/2, Src, Rac, Stat, PLC и другие менее каноничные пути [36, 148]. Однако из-за многокомпонентного состава выявление отдельных путей, задействованных в реализации эффектов секрета МСК, является нетривиальной задачей.

С другой стороны, множество секретируемых МСК компонентов могут быть вовлечены в регуляцию мишеней ниши ССК по разным механизмам, что делает продукты секреции МСК перспективными субстанциями для восстановления ниши ССК и, следовательно, сперматогенеза. При лечении мужского бесплодия не требуется дифференцировка МСК в другие типы клеток, поскольку основные эффекты связаны с секрецией набора паракринных факторов — секрета. Использование продуктов секреции МСК является целесообразной идеей с точки зрения безопасности. Использование секрета МСК снимает ряд проблем клеточной терапии, связанных с иммунным ответом на чужеродные клетки, который может вызвать воспаление и потерю эффективности, а также с возможностью перерождения введённых клеток в опухолевые [51].

Было проведено множество работ *in vivo* на животных по введению МСК из разных источников (мозг, жировая ткань, пульпа и т.д.) и их продуктов секреции в яички с целью восстановления сперматогенеза. В нескольких из них была показана эффективность секрета МСК, который вводили животным после токсического повреждения бусульфаном [6, 25]. На модели двустороннего абдоминального крипторхизма у крыс также было показано, что МСК и их секретом могут участвовать в восстановлении функции поврежденной ниши ССК за счёт воздействия на ССК, клетки Сертоли и клетки Лейдига [114].

Таким образом, секретом МСК может быть перспективной основой для создания препарата для восстановления сперматогенеза. При этом, прежде чем препарат на основе секрета МСК сможет быть использован в клинической практике, необходимо подтвердить его эффективность и безопасность в регуляторных доклинических и клинических исследованиях, а также определить критерии его стандартизации.

6. Проблемы стандартизации препарата на основе секретома МСК

МСК, которые являются платформой для получения секретома и его производных, обладают большой вариабельностью. В настоящее время существуют различные методы выделения МСК, при этом отсутствуют единые стандартизированные протоколы GMP. Даже в условиях одного производства и одного протокола у МСК существует вариабельность, в связи с различиями доноров: их возрастом, полом, историей болезни [136, 144]. Для уменьшения такой вариабельности первым делом определяют критерии включения и исключения доноров. Однако, МСК, полученные даже от одного донора и из одного источника, могут обладать гетерогенностью внутри одной популяции. Например, МСК из пуповины, полученной от одного и того же донора отличаются по экспрессии гена-маркера нейронной линии NESTIN и, соответственно, по иммуносупрессивным свойствам.

Для повышения эффективности и уменьшения вариабельности МСК могут быть добавлены дополнительные параметры скрининга для выбора клеток с наилучшими характеристиками для лечения конкретного заболевания. Например, для снижения гетерогенности МСК некоторые авторы предлагают тест, который позволяет выбирать подходящие популяции для дифференцировки в направлении кости. Например, было предложено измерять уровень мРНК TGF β 2, поскольку индукция экспрессии коррелирует со способностью МСК к образованию костной ткани [94].

В последние годы несколько фармацевтических компаний, занимающихся стволовыми клетками, сформулировали собственные критерии отбора клеток: например, компания Mesoblast предлагает обогащение продукта мезенхимными клетками-предшественниками STRO-1+ и STRO-3+, а Osiris Therapeutics — отбор МСК, секретирующих рецептор TNF- α типа I на уровне не менее 13 пг/10 миллионов клеток [120]. Другим подходом для снижения гетерогенности может быть обработка МСК веществами, активирующие терапевтически значимые пути или секрецию терапевтически важного фактора. Так, с помощью транскриптомного анализа авторы обнаружили, что активация сигнализации IFN- γ и NF- κ B была

положительно связана с иммуномодулирующей функцией МСК [155]. Следующий подход к снижению гетерогенности заключается в объединении МСК или секретомов МСК от разных доноров для получения однородной серии [62, 121]. Однако стоит отметить, что объединение решает проблему неоднородности только в пределах одного объединенного образца, в то время как разные объединенные партии все равно будут отличаться. Для решения этой проблемы возможно использование секретома от иммортализованной стандартизированной линии МСК, однако использование МСК в качестве продуцента требует обширных исследований безопасности [141].

7. Регуляторный статус лекарственного препарата на основе секретома МСК

Для разработки лекарственного препарата на основе секретома МСК важно корректно определить его регуляторный статус и выбрать нормативные документы, на основании которых будут проводиться исследования. В соответствии с Решением Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 секретом МСК может быть отнесён к биологическим лекарственным препаратам, так как представляет собой субстанцию, полученную из биологического источника — клеток жировой ткани человека. В законодательстве Российской Федерации в ФЗ 61, в ФЗ №180 “О биомедицинских клеточных продуктах”, нет информации про биологические препараты. Учитывая то, что правила ЕАЭС действительны на территории РФ и являются приоритетными, следует руководствоваться требованиями ЕАЭС о биологических лекарственных препаратах.

Примечательно, что в регуляторной практике FDA (США) и EMA (Европа) большинство продуктов, получаемых из МСК, не относятся к категории биологических лекарственных средств. Это связано с тем, что указанные требования применимы только к тем препаратам, которые могут быть подробно охарактеризованы и высокоочищены с использованием надлежащего набора аналитических методик. Хотя препарат на основе секретома МСК по своим

свойствам во многом приближен к группе биологических лекарственных средств, необходимо использовать и другие руководства, регламентирующие разработку высокотехнологичных клеточных лекарственных препаратов: клеточных препаратов, поскольку источником секрета являются клетки; а также генотерапевтических препаратов — в случае, если в производстве препарата применяются генетические конструкции.

Глава 2. Материалы и методы

1. Получение МСК из жировой ткани человека

МСК от различных доноров были получены из биобанка Центра регенеративной медицины МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова. Формирование биобанка осуществляется в соответствии с разрешением институционального локального этического комитета (Этический комитет МНОИ МГУ, IRB00010587; протокол № 4 от 04.06.2018), при обязательном получении письменного информированного согласия от всех доноров. Клеточные культуры выращивали в среде, предназначенной для поддержания недифференцированных мезенхимных прогениторных клеток — Advance Stem Cell Basal Medium (HyClone) с добавкой 10% Advance Stem Cell Growth Supplement (HyClone) и 100 ед/мл пенициллина/стрептомицина (Gibco). Среду обновляли каждые 3–4 дня, пассирование клеток осуществляли при достижении ими примерно 80% конfluence.

2. Получение и фракционирование секрета МСК человека

Для получения секрета МСК жировой ткани человека клетки пятого пассажа, достигшие примерно 80% конfluence, трижды промывали раствором Хэнкса. Затем раствор заменяли на среду ДМЕМ с низким содержанием глюкозы и инкубировали в течение 7 суток. После этого кондиционированную среду, включающую компоненты секрета МСК, собирали и очищали от клеточных примесей посредством поэтапного центрифугирования: сначала при 300 g в течение 10 мин при +4 °C, затем при 2000 g в течение 30 мин.

Для выделения фракции внеклеточных везикул и фракции растворимых молекул (вневезикулярной фракции секрета) применяли ультрафильтрацию с использованием центриконов VivaSpin (размер пор 300 кДа, Sartorius).

3. Концентрирование секрета МСК человека

Для концентрирования секрета МСК использовали простерилизованные этиленоксидом фильтры-концентраторы «JetSpin» (размер пор 10 кДа, Jet Bio-

Filtration). После этого секретом МСК наносили на фильтры и центрифугировали при 3000 g до достижения требуемой степени уменьшения объёма по сравнению с исходным. Полученный 50-кратный раствор либо замораживали при -80°C , либо дозировали во флаконы по 0,5 мл с последующей лиофилизацией и хранением при температуре $+2\dots+8^{\circ}\text{C}$.

Концентрирование везикулярной фракции проводили в 50 раз на центриконах «VivaSpin» с размером пор 300 кДа (Sartorius) в центрифуге с режимом 1500 g $+4^{\circ}\text{C}$, концентрирование фракции растворимых факторов — в 50 раз на фильтрах-концентраторах «JetSpin» (размер пор 10 кДа, Jet Bio-Filtration).

4. Получение готовой лекарственной формы препарата на основе секрета МСК

Секретом МСК представляет собой комплекс факторов, секретируемых мезенхимными стромальными клетками. В состав секрета МСК входит множество регуляторных молекул: факторы роста (VEGF, GDNF, BDNF, FGF, PEGF и др.), интерлейкины (IL-6, IL-8 и др.), цитокины (CCL2; CXCL-3, CXCL-5, CXCL-10 и др.), белки внеклеточного матрикса (фибронектин, коллагены, ламинины, фибулины, аргин, бигликан и др.), другие регуляторные белки (ингибин А, тромбоспондин-1, MMP-2, MMP-9, програнулин, UPAR, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6, IGFBP-7, Т-кадгерин, PAI-1, PAI-2 и др.) [69]. Важным компонентом секрета МСК являются регуляторные РНК (микроРНК-21, микроРНК-29с и др.) в составе внеклеточных везикул [16] [72].

Препарат на основе секрета МСК представляет собой лиофилизат концентрированного секрета МСК. Готовую лекарственную форму для введения животным получали путём смешивания 1 части по объёму восстановленного из лиофилизата раствора секрета МСК и 4 частей по объёму свиного коллагена Аппликолл (ООО «МакМеди») для получения необходимой дозы для введения. Перед смешением коллагеновый гель Аппликолл предварительно нагревали до 37°C до достижения жидкого состояния.

5. Экспериментальные животные в исследовании безопасности секретома МСК

Согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств, оценка общей токсичности фармакологического вещества проводится на двух уровнях доз. Терапевтическая доза была определена по результатам изучения эффективности препарата на основе секретома МСК в модели крипторхизма у крыс [5, 114]. Оценивали дозы, превышающие терапевтическую (ТД) в 1,5 раза (1,5 ТД) и 2,5 раза (2,5 ТД), с целью выявления дозозависимых токсических эффектов. Безопасность препарата изучали на двух видах животных — грызунах (мышях и крысах) и негрызунах (кроликах), что является обязательным условием для доклинических исследований оригинальных лекарственных средств [3, 4].

5.1. Оценка местной переносимости, общетоксических свойств и репродуктивной токсичности препарата на основе секретома МСК на крысах

В исследовании использовали половозрелых крыс линии Wistar: самцов массой тела 276 ± 23 г и самок — $278 \pm 2,5$ г. Возраст на момент начала эксперимента 10–12 недель (питомник АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»). Проведение эксперимента было одобрено биоэтической комиссией (БЭК) АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (протоколы заседаний БЭК от 07.12.2020 № 1.67/20 и № 2.67/20). Животных содержали по пять особей в клетке в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях.

Препарат на основе секретома МСК или контрольное вещество (среда ДМЕМ с низким содержанием глюкозы) вводили животным после наркоза. Наркотизацию осуществляли внутримышечным введением препаратов Золетил 100 (Vibrac, Франция) в дозе 25 мг/кг и Ксила (Interchemie, Нидерланды) в дозе 5 мг/кг. Дизайн исследования представлен в таблицах 2–4.

Таблица 2. Группы крыс для изучения общетоксических свойств и местной переносимости при локальном однократном введении

Гр. №	Количество самцов	Объект исследования	Доза и объём введения	День эвтаназии
1	15	– (интактные)	–	На 14-й день — по 5 животных каждой группы, на 42-й день — оставшиеся животные
2	15	Препарат на основе секрета МСК	1,5 ТД 100 мкл в каждый семенник	
3	15		2,5 ТД 100 мкл в каждый семенник	
4	10	Контрольное вещество (среда роста ДМЕМ с низкой глюкозой)	– 200 мкл на животное	

Таблица 3. Группы крыс для изучения общетоксических свойств и местной переносимости при многократном внутримышечном введении

Гр. №	Количество самцов	Объект исследования	Доза	День эвтаназии
5	10	Препарат на основе секрета МСК	1,5 ТД 0,8 мл/кг	На 14-й день — по 5 животных каждой группы, на 42-й день — оставшиеся животные
6	10		2,5 ТД 0,8 мл/кг	
7	10	Контрольное вещество (среда роста ДМЕМ с низкой глюкозой)	– 0,8 мл/кг	

Таблица 4. График манипуляций с крысами в исследовании безопасности при однократном и многократном введении

Манипуляции	Дни эксперимента
Регистрация массы тела	1-й (до введения) и далее еженедельно
Введение под белочную оболочку семенника животных групп №№2–4	1-й
Внутримышечное введение животным групп №№5–7	1-й, 6-й и 12-й
Клиническое наблюдение с оценкой картины интоксикации	Ежедневно
Клинический осмотр	Еженедельно
Оценка потребления корма и воды	Еженедельно
Оценка индивидуального поведения	10-й и 38-й
Сбор образцов мочи для общего анализа	11-й и 39-й
Взятие образцов крови для гематологического анализа	13-й и 41-й
Измерение уровня глюкозы в периферической крови	14-й и 42-й
Взятие образцов крови для биохимического анализа	14-й и 42-й
Оценка спермограммы животных группы №6	14-й и 42-й
Эвтаназия 5 животных каждой группы	14-й
Эвтаназия всех оставшихся животных	42-й

5.2. Исследование репродуктивной (генеративной токсичности) на крысах

Исследование проводили согласно дизайну, приведённому в таблицах 5,6.

Таблица 5. Группы крыс при исследовании репродуктивной токсичности

№ группы	Число животных		Объект для введения	Доза	Число животных	
	Самцы	Самки			Эвтаназия самок	Роды и наблюдение за развитием потомства
1 или 1а (потомство)	15	–	– (интактные)	–	–	–
	–	20	– (интактные)	–	10	10
2 или 2а (потомство)	15	–	Препарат на основе секретома МСК	1,5 ТД	–	–
	–	20	– (интактные)	–	10	10
3 или 3а (потомство)	15	–	Препарат на основе секретома МСК	2,5 ТД	–	–
	–	20	– (интактные)	–	10	10

Таблица 6. График манипуляций с крысами в исследовании репродуктивной токсичности

Манипуляции	Дни эксперимента
Введение тестируемого препарата	1-й день эксперимента
Регистрация массы тела животных	1-й (до введения) и далее еженедельно
Клиническое наблюдение за животными	Ежедневно
Клиническое наблюдение за беременными животными	Ежедневно
Оценка потребления корма и воды у самцов групп №№1-3 ^а , беременных самок и потомства групп №№1а-3а после отсадки от матерей	Еженедельно
Процедура спаривания	Группы №№1-3: 15-28-й Группы №№1а-3а: 109-122-й дни
Определение дня беременности	Группы №№1-3: с 16-го по 28-й и Группы №№1а-3а: с 110-го по 122-й дни
Регистрация массы тела беременных самок крыс	1-3-й, 10-11-й и 16-19-й дни беременности
Эвтаназия самцов 5 самцов групп №№1-3, для оценки спермограммы	14-й день
Эвтаназия оставленных самцов	42-й день
Анализ спермограммы	14-й и 42-й дни
Эвтаназия 50% беременных самок каждой группы и оценка эффективности оплодотворения	20–21-й день беременности
Отсадка матерей от потомства	25–30-й день после рождения
Наблюдение за потомством	39–84-й дни
Эвтаназия потомства групп №№2 и 3	По окончании периода наблюдения

5.3. Изучение иммунотоксичности препарата на основе секрета МСК на мышах

В исследовании использовали самцов мышей линии С57В1/6 массой 16–25 г. Возраст на начало эксперимента 6–7 недель. Было получено одобрение биоэтической комиссии (№ БЭК 1.69/20 от 14.12.2020 г.).

Для изучения гуморального, клеточного и неспецифического иммунного ответа были сформированы следующие группы, представленные в таблице 6. Секретом МСК вводили в дозах ниже и выше терапевтической согласно дизайну исследования, представленного в таблицах 7-10.

Таблица 7. Характеристика групп мышей при однократном введении для изучения иммунотоксичности

Группа №	Исследуемый объект	Доза	Способ и схема введения
1	Интактные животные	–	Внутримышечно, однократно
2	Препарат на основе секрета МСК	0,75 ТД	
3		1,25 ТД	

Таблица 8. График проведения исследования гуморального иммунного ответа (число мышей в каждой группе 10)

Манипуляции	Дни эксперимента
Внутримышечное введение тестируемого препарата	1-й
Регистрация массы тела животных	1-й
Клиническое наблюдение за животными	Ежедневно
Иммунизация. Введение эритроцитов барана	4-й
Эвтаназия животных	11-й
Оценка титра антител	11-й

Таблица 9. График проведения исследования клеточного иммунного ответа (число мышей в каждой группе 10)

Манипуляции	Дни эксперимента
Внутримышечное введение тестируемого препарата	1-й
Регистрация массы тела животных	1-й
Клиническое наблюдение за животными	Ежедневно
Сенсибилизация ДНХБ	4-й
Введение разрешающей дозы ДНХБ	10-й
Эвтаназия и учет реакции	11-й

Таблица 10. График проведения исследования неспецифического иммунного ответа (число мышей в каждой группе 10)

Манипуляции	Дни эксперимента
Внутримышечное введение тестируемого препарата	1-й
Регистрация массы тела животных	1-й
Клиническое наблюдение за животными	Ежедневно
Введение 3% тиогликолевой среды	8-й
Эвтаназия и забор перитонеального экссудата	11-й
Постановка тестов по изучению фагоцитарной активности макрофагов	11-й

5.4. Исследования общетоксических свойств, местной переносимости и фармакологической безопасности препарата на основе секрета МСК на кроликах

В исследовании использовали 50 половозрелых самцов кроликов породы Советская шиншилла, распределённых на 5 групп по 10 животных, с массой тела $3493 \pm 380,8$ г. Возраст на момент начала эксперимента 4–5 месяцев (питомник ФГУП ОПХ «Манихино»). Получено разрешение биоэтической комиссии (БЭК) АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (протокол заседания БЭК от 27.09.2023 № 1.41/23). Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях, а также с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных. Препарат на основе секрета МСК или плацебо (смесь коллагена Аппликолл с водой для инъекций) вводили животным после наркоза с внутривенным применением 25 мг/кг Золетила 100 и 5 мг/кг Ксила. Дизайн исследования представлен в таблицах 11 и 12.

Таблица 11. Характеристика групп самцов кроликов

Группа	Исследуемый объект	Путь и схема введения	Доза	Количество животных
1	Интактная группа	Без введения	-	10
2	Плацебо (коллаген Аппликолл + вода для инъекций)	Под белочную оболочку семенника, двукратно	-	10
3	Препарат на основе секретомы МСК		ТД	10
4			1,5 ТД	10
5			2,5 ТД	10

Таблица 12. График манипуляций на кроликах

Манипуляции	Дни эксперимента
Общеклиническое наблюдение	Ежедневно
Регистрация массы тела	Еженедельно
Введение объектов исследования	1-й день, 28-й день
Регистрация температуры тела	На 1-й и 28-й день (до введения, через 3 часа)
Тест Ирвина с модификацией для оценки функционального состояния центральной нервной системы	2-й, 29-й и 58-й дни
Сбор образцов мочи (4, 24 часа)	29-30-й и 58-59-й дни
Взятие образцов крови для гематологического и биохимического анализа, оценки состояния системы гемостаза	3-й, 30-й и 59-й дни
Взятие образцов крови для определения газового состава крови	30-й и 59-й дни
Регистрация электрокардиограммы (ЭКГ), частоты сердечных сокращений (ЧСС), артериального давления (АД), частоты дыхательных движений (ЧДД)	28-й (после введения) и 57-й дни
Анализ спермограммы	31-й день, 60-й день
Эвтаназия 50% животных каждой группы	31-й день
Эвтаназия оставшихся животных	60-й день

5.5. Методы оценки показателей безопасности у животных

Общеклиническое наблюдение. У животных регистрировали: поведение, положение тела в пространстве, состояние шерстяного покрова, дефекацию и изменения в месте введения. Более детальный осмотр не выполняли, так как не отмечали выраженных признаков интоксикации, которые свидетельствовали об отклонении от нормы состояния животных.

Анализ мочи. Для сбора мочи животных помещали в специальные индивидуальные клетки со стеклянным гранулятом. После сбора образцы мочи переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин. Аликвоты надосадочной жидкости переносили в 96-луночные планшеты для проведения качественного анализа на наличие патологических компонентов мочи. Общий анализ включал определение эритроцитов (амидопириновая проба), общего белка (реакция с пирогалловым красным), глюкозы (глюкозооксидазный метод), билирубина (диазонирование сульфаниловой кислотой по методу Маллоя-Эвелина), а также измерение относительной плотности и рН. Для оценки рН использовали тест-полоски (DF, Китай), а плотность мочи определяли с помощью рефрактометра AMTAST VUR3T (AMTAST, США). Микроскопическое исследование осадка мочи не проводилось, так как положительные реакции на кровь не выявлялись. Пробы, собранные за 24 часа, применялись для расчёта суточного диуреза. В объединённой пробе с использованием биохимического анализатора Random Access A-25 (Biosystem, Испания) определяли концентрации креатинина (с последующим расчётом клиренса креатинина) и мочевины.

Оценка гематологических показателей. Оценка гематологических показателей проводилась в прижизненно забранной крови из краевой вены уха. 0,2 мл крови помещали в пробирки Impromini с трикалиевой солью ЭДТА (К3) в качестве антикоагулянта (IMPROVE, Китай). В цельной крови с добавленным антикоагулянтом на гематологическом анализаторе Mythic 18 (Orphee, Швейцария) определяли следующие параметры: количество эритроцитов ($10^{12}/л$), уровень гемоглобина (г/л), гематокрит (%), количество лейкоцитов ($10^9/л$), количество тромбоцитов ($10^9/л$), а также относительные показатели лимфоцитов (%), моноцитов (%) и гранулоцитов (%).

Определение параметров гемостаза. Кровь прижизненно забирали из краевой ушной вены в объёме 0,7 мл в пробирки, содержащие 3,8% раствор цитрата натрия. Для получения плазмы пробы центрифугировали на центрифуге Z216МК (Hermle Labortechnik, Германия) в течение 15 минут при 1800 g (4350 об/мин). В

полученной цитратной плазме с использованием коагулометра АПГ4-02-П (ООО «ЭМКО», Россия) определяли протромбиновое время (ПВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и концентрацию фибриногена.

Оценка биохимических показателей крови. Кровь забирали из краевой ушной вены в пробирки Improvacuter с активатором свертывания (IMPROVE, Китай). Для получения сыворотки образцы центрифугировали на лабораторной клинической центрифуге ОПн-3.04 «Дастан» (ОАО «ТНК «Дастан», Кыргызская Республика) в течение 15 минут при 3000 об/мин. В сыворотке определяли биохимические показатели крови, включая аланинаминотрансферазу, аспаратаминотрансферазу, общий белок, альбумин, креатинин, мочевины, общий билирубин, общий холестерин, триглицериды, щелочную фосфатазу, глюкозу и лактатдегидрогеназу, с помощью биохимического анализатора Random Access A-25 (Biosystems, Испания).

Оценка фармакологической безопасности

Влияние на сердечно-сосудистую систему. Регистрацию ЭКГ осуществляли у наркотизированных животных с помощью компьютерного ветеринарного электрокардиографа Поли-спектр-8/Е (Нейрософт, Россия) в течение не менее 60 секунд. В неинвазивном варианте исследования применяли многоразовые прижимные электроды. Оценивали следующие параметры: частоту сердечных сокращений, интервал RR (мс), зубец Р (мс), интервал PQ (мс), комплекс QRS (мс) и интервал QT (мс). После проведения ЭКГ у животных измеряли систолическое артериальное давление неинвазивным методом с использованием ветеринарного монитора давления Zoomed BPM-2 (Zoomed, Россия).

Влияние на дыхательную систему. Оценку частоты дыхательных движений проводили визуально за 1 мин у предварительно наркотизированных животных.

На 30 и 59 сут эксперимента были отобраны образцы артериальной крови для определения газового состава крови. Кровь отбирали из центральной ушной артерии при помощи катетера 26G в шприцы в объеме 50–100 мкл и при помощи газоанализатора i-STAT (Abbott, США) и затем определяли парциальное давление

кислорода, насыщение гемоглобина кислородом, парциальное давление углекислого газа.

Оценка функционального состояния центральной нервной системы. Использовали рекомендованную руководством S7A ICH батарею тестов, предложенной S. Irwin, с модификациями [68, 98]. Для оценки возможных поведенческих и/или физиологических изменений регистрировали наличие или отсутствие патологических признаков, указывающие на возбуждение или седацию, стереотипные движения, изменения в локомоторной активности, оценку рефлексов, оценку состояния вегетативной нервной системы и дыхания.

Оценка нефротоксичности. Оценка нефротоксичности включала измерение суточного диуреза; анализ общих показателей мочи, таких как относительная плотность, pH, содержание глюкозы, билирубина, белка, крови и кетоновых тел; определение биохимических параметров мочи — креатинина и мочевины; расчёт клиренса креатинина; оценку массовых коэффициентов органов, а также проведение гистологического исследования почек.

Оценка пирогенности

Температуру тела измеряли на 1-е и 28-е сутки — до введения и через 3 часа после введения исследуемого препарата или плацебо — с использованием ректального термометра (ректального датчика) на ветеринарном пациентском мониторе Zoomed IM-10 (ЗАО «Ист Медикал», Россия). Испытание проводили на кроликах с исходной температурой 38,8–39,1 °С, которая статистически не различалась между группами. В рамках данного эксперимента препарат считали апирогенным, если среднее повышение температуры не превышало 1,2 °С, а у каждого животного в группе индивидуальное увеличение не было более 0,5 °С [2].

Изучение иммунотоксических свойств

Проводили исследование гематологических и биохимических показателей крови, включая общее число лейкоцитов, абсолютные дифференциальные показатели лейкоцитов и уровень глобулинов. Выполняли гистологическое исследование органов (тимус, селезёнка, паховые лимфатические узлы, костный мозг) и оценивали массовые коэффициенты тимуса и селезёнки [45].

Оценка местной переносимости

Для оценки местной переносимости при некропсии визуально оценивали макроскопические изменения в тканях семенника, а также проводили гистологическую оценку тканей, непосредственно контактировавших с исследуемыми объектами.

Процедура спаривания у крыс

К самцам крыс подсаживали интактных самок в соотношении 1 самец на 2 самки. После достижения потомством экспериментальных животных возраста 10 недель самцы и самки одной группы, но от разных родителей, также спаривали в соотношении 1:2. Через 20–24 часа после подсадки самок извлекали из клетки для проверки на наличие спермы и/или вагинальной пробки. Определение спермы проводили методом микроскопического экспресс-анализа нативных мазков-смывов из влагалища самки. При обнаружении сперматозоидов и/или вагинальной пробки фиксировали дату начала беременности в первичной карте самки. Если сперматозоиды не выявлялись, самку оставляли с самцом ещё на сутки и повторяли процедуру забора влагалищного лаважа.

Эвтаназия

Животных эвтаназировали при помощи наркотизации с последующим удалением жизненно важных внутренних органов [158].

Патоморфологическое исследование

Органы, извлеченные при некропсии, были оценены на предмет наличия патологических признаков и взвешены. Данный показатель использован для расчета процентного отношения массы органов к массе тела по формуле (1):

$$\frac{m_o}{m_m} \times 100, \quad (1)$$

где m_o – масса органа, m_m – масса тела животного.

Процедуру взвешивания внутренних органов осуществляли на электронных весах ВК-300 (ЗАО «Масса-К», Россия).

У животных отбирали органы и ткани для исследования, включая головной и спинной мозг, гипофиз, аорту, сердце, легкие с бронхами, трахею, тимус, слюнные железы, пищевод, желудок, двенадцатиперстную, подвздошную и толстую кишку,

печень, поджелудочную железу, селезёнку, почки, мочевой пузырь, желчный пузырь, надпочечники, семенники и придаток левого семенника (эпидидимис), простату, семенные пузырьки, паховые лимфатические узлы, щитовидную и паращитовидные железы, глазные яблоки, Гардерову железу, кожу, кости с костным мозгом (бедренная кость с сохранением эпифиза), скелетные мышцы, а также органы с макроскопическими изменениями, выявленными при некропсии.

Органы, подлежащие взвешиванию, включали головной мозг, сердце, легкие с трахеей, тимус, печень, селезёнку, почки, надпочечники и семенники. Для последующего гистологического анализа все органы и ткани фиксировали в течение 24 часов в 10% растворе нейтрального формалина [1]. После фиксации была проведена гистологическая проводка — дегидратация материала была проведена при помощи автоматического гистопроектора KD-TS3S1 (Китай) в изопропиловых спиртах восходящей концентрации с последующей инфльтрацией парафином при температуре 55-57°C. Полученные фрагменты заливали в парафиновые блоки, из которых изготавливали срезы толщиной 3–5 мкм. Гистологические срезы депарафинизировали в ксилоле, окрашивали гематоксилином и эозином с использованием автоматической станции для окраски гистологических препаратов KD-RS (Китай), затем после просветления закрепляли под покровным стеклом. Исследование препаратов проводили на световом микроскопе Микромед 2 (Россия) при увеличении 40×, 100× и 400×. Микрофотографии выполняли с помощью цифровой камеры TourCam UCMOS05100KPA (Китай) и программного обеспечения TourView версии 3.7.7892.

Исследование гуморального иммунного ответа

Иммунизация

На 4-й день эксперимента животным однократно вводили внутривентриально суспензию эритроцитов барана (ЗАО «ЭКОлаб») с помощью трёхкомпонентного шприца и иглы диаметром 23G. Доза составляла 5×10^7 ЭБ на мышь в объёме 200 мкл на животное.

Эвтаназия и получение сыворотки крови

На 11-й день эксперимента животных эвтаназировали на начальном этапе с использованием диоксида углерода (CO₂), после чего забирали максимальное количество крови (500–1000 мкл) непосредственно из сердца. Кровь выдерживали в чистых пробирках при комнатной температуре в течение 30 минут до образования тромба, затем центрифугировали при 300 g в течение 10 минут при комнатной температуре. Из полученной пробы отбирали 100 мкл сыворотки в отдельные пробирки. Для инактивации комплемента сыворотку инкубировали при 56 °С в течение 30 минут в водяном термостате ELMİ TW-2 (заводской № 1720167, производитель СИА «ЭЛМИ», Латвия). Титр антител в сыворотке определяли методом гемагглютинации.

Постановка реакции гемагглютинации с эритроцитами барана (ЭБ)

В 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических реакций («Медполимер») готовили двукратные разведения исследуемой сыворотки в двух повторностях по 100 мкл (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048). В контрольную лунку добавляли 100 мкл физиологического раствора. Во все лунки вносили по 50 мкл 1% суспензии ЭБ в физиологическом растворе. Планшеты инкубировали в лабораторном CO₂-инкубаторе Shellab 3517-2 (заводской № 07060410, Shel Lab, USA) при 37 °С в течение 2 часов, после чего регистрировали реакцию. Положительная реакция проявлялась оседанием эритроцитов на дне лунки в форме зонтика, отрицательная — в виде компактной «пуговки».

Исследование клеточного иммунного ответа

Сенсибилизация

На 4-й день эксперимента мышам однократно выполняли подкожную инъекцию 0,5% раствора ДНХБ (Sigma-Aldrich) в диметилсульфоксиде (ДМСО) в межлопаточную область в объёме 200 мкл на животное.

Введение разрешающей дозы ДНХБ

На 10-й день исследования животным вводили вторую инъекцию 0,05 мл 0,1% раствора ДНХБ в 50% ДМСО под плантарный апоневроз правой тазовой

конечности («опытная» конечность). В левую тазовую конечность («контрольную») вводили 0,05 мл стерильного физиологического раствора на животное.

Эвтаназия и оценка реакции

Через 24 часа после введения разрешающей дозы животных эвтаназировали с использованием диоксида углерода (CO₂), а на конечном этапе выполняли цервикальную дислокацию. Тазовые конечности отсекали по уровню тибготарзального сустава и взвешивали на аналитических весах Adventurer RV214 (OHAUS Corp, Китай). На основе полученных данных рассчитывали индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) по формуле (2):

$$I_p = \frac{M_{оп} - M_{к}}{M_{к}} \times 100\% , \quad (2)$$

I_p – индекс реакции ГЗТ, $M_{оп}$ – масса правой «опытной» конечности, $M_{к}$ – масса левой «контрольной» конечности.

Исследование неспецифического иммунного ответа

Введение 3% тиогликолевой среды

Животным групп на 8-й день исследования тремя частями с промежутком 1 ч вводили 3 мл 3% тиогликолевой среды внутривентрально.

Изоляция перитонеальных макрофагов

На 11-й день эксперимента производили забор перитонеального экссудата. Для этого животных сначала эвтаназировали с использованием диоксида углерода (CO₂) на начальном этапе, а на конечном этапе выполняли цервикальную дислокацию. Все последующие манипуляции проводили под ламинарным потоком воздуха для обеспечения максимально стерильных условий.

Сначала брюшную стенку мышей обрабатывали 70% этанолом. Затем аккуратно удаляли кожу на передней части брюшной стенки. С помощью шприца в брюшную полость вводили 10 мл физиологического раствора комнатной температуры. После лёгкого массажа брюшной полости экссудат собирали шприцем в пробирки объёмом 15 мл. Процедуру повторяли 5–6 раз, при этом объём вводимого физиологического раствора составлял 5 мл.

Собранный перитонеальный экссудат центрифугировали на центрифуге СМ-6МТ (СИА «ЭЛМИ», Латвия) при 300 g в течение 10 минут.

Изучение фагоцитарной активности макрофагов

Осадок клеток ресуспендировали в среде ДМЕМ с 10% фетальной бычьей сыворотки и переносили в стерильные чашки Петри, на дно которых предварительно укладывали по два покровных стекла. Суспензию каждого животного (10 мл) инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С и 5% CO₂ в течение 2 часов. Одновременно готовили питательную среду с добавлением $0,5 \times 10^{10}$ частиц латекса. После инкубации неадгезированные клетки удаляли, а чашки промывали физиологическим раствором. Затем к каждой чашке добавляли 10 мл среды с латексными частицами, обеспечивая соотношение макрофагов и частиц 1:100, и инкубировали при тех же условиях в течение 3 часов. После завершения инкубации клетки снова промывали и окрашивали покровные стекла методом Романовского-Гимза прямо в чашках, затем высушивали при комнатной температуре. Для подавления флуоресценции частиц, не захваченных макрофагами, в чашки добавляли раствор трипанового синего на одну минуту. После этой процедуры покровные стекла помещали на предметное и проводили микроскопический анализ с использованием флуоресцентной (Filter set 09 для возбуждения FITC) и световой микроскопии на Axio Lab.A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

Анализ результатов

Определяли число частиц, захваченных 100 макрофагами, после чего рассчитывали индекс фагоцитарной активности как отношение общего числа поглощённых латексных частиц к количеству макрофагов.

6. Оптимизация экспериментальной модели токсического повреждения сперматогенеза

Исследование проводили на зрелых самцах мышей линии C57Bl/6 в возрасте 3,5–4,0 месяцев с массой тела 15–23 г. Эксперименты выполняли в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/EU и одобрением биоэтическим комитетом МГУ имени М.В. Ломоносова (номер заявки 90-ж). Животные были получены из питомника Филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.»

В качестве повреждающего агента был выбран доксорубин, поскольку по литературным данным он повреждает нишу ССК комплексно, воздействуя и на стволовые клетки, и на основные поддерживающие клетки ниши. Доксорубин хлорид представляет собой лиофилизат для приготовления раствора для внутрисосудистого и внутрипузырного введения в виде пористой массы красного цвета, гигроскопичен. Вспомогательные вещества — маннитол. В клинической практике доксорубин вводят внутривенно, внутрипузырно или внутриартериально. Режим дозирования и схему применения устанавливают индивидуально, в зависимости от показаний и состояния пациента. В качестве монотерапии рекомендуемая стандартная доза на цикл для взрослых составляет 60–90 мг/м². В пересчёте на мышь были взяты несколько доз, вводимых внутривентрально: 0,25, 0,5 и 1 мг/кг (количество животных в каждой группе 3) с периодичностью раз в два дня.

Оценку повреждения проводили через 5 и 10 недель (срок, кратный 1 и 2 циклам сперматогенеза). Для этого проводили эвтаназию животных, выделяли семенники с последующей окраской срезов гематоксилином и эозином. Затем гистологическим анализом оценивали структуру семенных канальцев. Для оценки фертильности самцов проводили исследование с подсадкой самок в соотношении 1 самец: 2 самки и последующей оценкой беременностей.

7. Исследование эффективности препарата на основе секретома МСК и выбор суррогатного фактора, отражающего фармакологическую активность

На основании предыдущего исследования выбран режим дозирования доксорубицина гидрохлорида: внутривенно в дозе 1 мг/кг с периодичностью раз в два дня. Суммарная доза введённого доксорубицина составила 10 мг/кг. Препарат на основе секретома МСК в терапевтической дозе вводили однократно под белочную оболочку яйца сразу после токсического повреждения (на 21 день после начала манипуляций с животными). Препарат сравнения токоферола ацетат вводили перорально сразу после токсического повреждения (на 21 день после начала манипуляций с животными). Расчёт дозы токоферола проводили следующим образом: эффективная доза у животных составляет 200 мг/кг 10% раствора, следовательно на одно животное требуется 4 мг (на животное массой 20 г необходимо вводить 40 мкл 10% раствора токоферола). Режим дозирования — 160 мкл 1 раз в 4 дня перорально.

Для изучения эффективности препарата на основе секретома МСК и выявления суррогатного фактора были сформированы следующие группы, представленные в таблице 13.

Таблица 13. Характеристика групп самцов мышей

Группа	Исследуемый объект	Путь и схема введения	Доза	Количество животных
1	Интактная группа	Без введения	-	6
2	Без терапии	Без введения	-	6
3	Препарат сравнения токоферол	Перорально 1 раз в 4 дня	160 мкл	6
4	Препарат на основе секретома МСК	Однократно, под белочную оболочку яичка	1 ТД	6
5	Препарат на основе секретома МСК с антителами к VEGF		1 ТД	3
6	Препарат на основе секретома МСК с контрольными изотипическими антителами к VEGF		1 ТД	3
7	Препарат на основе секретома МСК с антителами к GDNF		1 ТД	3
8	Препарат на основе секретома МСК с контрольными изотипическими антителами к GDNF		1 ТД	3
9	Фракция секретома МСК «растворимые факторы»		1 ТД	3

Готовую лекарственную форму препарата на основе секретома МСК вводили под белочную оболочку яичка мыши в терапевтической дозе, определённой в предыдущих исследованиях. Объём введения составлял 100 мкл на животное. Технология получения готовой лекарственной формы описана ранее. Добавление соответствующих антител проводили на этапе перед лиофилизацией, удаление внеклеточных везикул — на этапе перед концентрированием.

Эвтаназию животных проводили с помощью диоксида углерода (CO₂) на 55-й день (5 недель после введения препарата на основе секретома МСК) и на 170-й день эксперимента (5 месяцев после введения препарата на основе секретома МСК). Сроки эвтаназии выбраны в соответствии с длительностью цикла сперматогенеза у мышей (35 дней). Выбранные сроки эвтаназии соответствуют 1 циклу (35 дней) и 4–5 циклам (5 месяцев) сперматогенеза [101].

После эвтаназии у самцов фиксировали семенники и забирали придатки для дальнейшего анализа.

7.1. Морфометрический анализ сперматозоидов

Во время некропсии у животных извлекали правый придаток, тщательно отделяя его от брыжейки. Эпидидимис помещали в пробирку 15 мл с раствором Хэнкса, содержащим 5% антибиотика. После взвешивания придаток измельчали в 200 мкл 10% раствора глюкозы. На предметное стекло наносили 10 мкл полученной спермы, накрывали каплю покровным стеклом размером 22×22 мм и подсчитывали количество сперматозоидов в поле зрения. Спермограмму оценивали по общему числу сперматозоидов ($\times 10^6/\text{мл}$) и характеру их движения (доля подвижных и неподвижных).

7.2. Гистологический анализ семенников

Во время эвтаназии у самцов забирали семенники для последующего гистологического анализа. Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 часов, после чего по стандартной методике заливали в парафин и готовили гистологические срезы толщиной 5–7 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а микроскопическое исследование выполняли с использованием микроскопа Leica DM600B, оснащённого камерой Leica DFC 420C (Leica Microsystems GmbH) и программным обеспечением LasX, выбирая репрезентативные поля зрения для получения микрофотографий.

7.3. Иммуногистохимический анализ семенников

Яички животных всех групп с через пять месяцев после введения образцов фиксировали в 10% растворе формалина и заливали в парафин. Готовили поперечные срезы толщиной 1 мкм, депарафинизировали их в толуоле и спиртовой батарее с постепенно убывающей концентрацией до воды, после чего проводили демаскировку антигенов на водяной бане в 0,1 М цитратном или Tris-буфере в течение 20 минут при 98 °С. В исследовании использовали антитела и красители: маркер ДНК — DAPI (Sigma, Германия); маркер пролиферирующих клеток — PCNA (M0879, Dako, США); маркеры M2 макрофагов — CD206 (ab64693, Abcam, США) и CD163 (ab182422, Abcam, США); маркер перитубулярных миоидных клеток — alpha-SMA (ab5694, Abcam, США); маркер клеток Сертоли — SOX-9

(ab185230, Abcam, США); маркер стромальных клеток, включая МСК — CD90 (PA5-80127, Invitrogen, США). Затем добавляли вторые антитела с флуоресцентной меткой Alexa 488 или Alexa 594 (Invitrogen).

Микроскопическое исследование проводили на Leica DM600B с камерой Leica DFC 420X (Leica Microsystems GmbH), выбирая не менее трех репрезентативных полей зрения. Обработку и количественный анализ изображений выполняли с использованием программного обеспечения LasX (Leica Microsystems GmbH) и Fiji.

8. Изучение биораспределения препарата на основе секрета МСК

Для изучения биораспределения препарата на основе секрета МСК использовали рекомбинантный белок GFP в качестве визуализируемого аналога секрета МСК. Анализ локального биораспределения препарата МедиРег изучали на интактных мышах и мышах с токсическим моделированием нарушений сперматогенеза путём введения коллагена Аппликолл или рекомбинантного GFP в смеси с коллагеном Аппликолл с последующей эвтаназией животных через 1 час и выделением семенников. Полученные семенники помещали в среду для заморозки Tissue-Tek с последующей заморозкой в жидком азоте и получением криосрезов. Для микроскопического анализа использовали микроскоп Leica DM600B снабженного камерой Leica DFC 420X (Leica Microsystems GmbH).

9. Выделение фракции, обогащенной клетками Лейдига, из семенников грызунов

После эвтаназии у крысы или у мыши половозрелого возраста (в период активного сперматогенеза) забирали семенники и помещали в раствор Хэнкса с 5% смесью антибиотиков (пенициллин-стрептомицин). В условиях стерильного ламинарного бокса снимали белочную оболочку и отделяли крупные сосуды. В чашке Петри промывали оставшиеся после снятия белочной оболочки семенные каналцы раствором Хэнкса с 5% антибиотиком 2–3 раза по 5 мл. Затем каналцы

переносили в стерильную пробирку, добавляли среду ДМЕМ 10 мл, содержащую 2,5 мг/мл трипсина и ДНКазу 10 мкг/мл (7–10 мл на одно яичко), и инкубировали при температуре 34-35°C в течение 4-10 мин, периодически помешивая. Добавляли среду, ингибирующую воздействие ферментов: ДМЕМ + 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), в объёме 20 мл, аккуратно перемешивали переворачиванием пробирки. Затем оставляли пробирку в вертикальном положении для осаждения канальцев, в то время как жидкость над канальцами содержала суспензию, обогащённую клетками Лейдига. После оседания канальцев жидкость над канальцами, содержащую клетки Лейдига, отбирали в новую пробирку. Повторяли пункт отмывки 5 раз. Полученную суспензию интерстициальных клеток (преимущественно клеток Лейдига) центрифугировали 300g в течение 10 мин, сливали надосадочную жидкость и осадок пипетировали в среде ДМЕМ-Ф12 + 2%ФБС + 1x инсулин-трансферрин-селенита (ITS), фильтровали полученную суспензию через фильтр 100 мкм. Клетки высаживали в 48-луночный планшет из расчёта 150 тыс. клеток на лунку.

10. Модель для оценки специфической активности секрета МСК *in vitro* на клетках Лейдига

Клетки Лейдига после выделения (день 0) рассаживали в лунки 48 луночного планшета в среде роста ДМЕМ/F12, 1x ITS и 2% ФБС. На следующий день после выделения (день 1) все лунки промывали 3 раза раствором Хэнкса по 0,5 мл и проводили смену среды. В лунках группы «контроль 2 дня» клетки ставили на кондиционирование — добавляли среду ДМЕМ с низкой концентрацией глюкозы (1 г/л) без фенолового красного. Объём среды в одной лунке 0,35 мл. На 2-й день собирали среду с лунок группы «контроля 2 дня», откручивали на центрифуге с режимом 300g в течение 10 мин для осаждения клеточного дебриса. Затем собирали супернатант и закладывали на хранение при температуре –80°C. К остальным лункам добавляли:

- В «контроль 4 дня» среду ДМЕМ с низкой концентрацией глюкозы (1 г/л) без фенолового красного.
- Секретом МСК.
- Секретом МСК с нейтрализующими антителами к VEGF.
- Секретом МСК с контрольными неспецифичными антителами.
- Секретом МСК с ингибитором микроРНК-21.
- Секретом МСК с ингибиторными контрольными олигонуклеотидами.
- Мимик микроРНК-21 с трансфекцией клеток Лейдига липофектамином согласно протоколу производителя.
- Неспецифический мимик микроРНК с трансфекцией клеток Лейдига липофектамином согласно протоколу производителя.

На 4-й день собирали среду с лунок каждой группы, откручивали на центрифуге с режимом 300g в течение 10 мин для осаждения клеточного дебриса. Затем собирали супернатант и закладывали на хранение при температуре -80°C . В полученном супернатанте после размораживания определяли количество тестостерона методом иммуноферментного анализа (DBC, Канада).

11. Определение количества ключевых компонентов в секрете МСК

11.1. Иммуноферментный анализ

Содержание фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в образцах секрета МСК определяли с помощью коммерческого набора для ИФА (R&D Systems) согласно протоколу производителя.

11.2. Оценка количества микроРНК с помощью количественной ПЦР в реальном времени

Выделение и очистку тотальной РНК проводили с помощью набора miRNeasy Mini Kit (Qiagen). Концентрацию и чистоту РНК определяли по соотношению длин волн 260/230 нм на спектрофотометре Nanodrop. Для следующего этапа обратной

транскрипции использовали miScript II RT Kit. Для ПЦР в реальном времени использовали набор miScript SYBR Green PCR Kit, QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, праймеры для микроРНК-21 и системы для проведения ПЦР в реальном времени QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific). Затем рассчитывали уровни экспрессии микроРНК сравнительным методом deltaCT относительно уровней RNU6.

12. Вестерн блоттинг

На этапе пробоподготовки клетки Лейдига лизировали в буфере Лэммли. Количество белка в лизате определяли с помощью метода анализа белка микроBCA. Лизаты, содержащие равное оптимальное количество белка, подвергали электрофорезу в геле. Электроперенос белков осуществляли на мембрану PVDF в 25 mM Трис-HCl буфере, pH 8,3, содержащем 192 mM глицина и 20% этанола (по объему). Мембраны блокировали в 5% растворе обезжиренного молока на ТБСТ в течение 30 мин при комнатной температуре, затем при +4 °C в течение ночи инкубировали с первичными антителами против рецептора лютеинизирующего гормона (bs-6431R, Bioss, США, разведение 1:500), против VEGFR2 (MA5-15157, Invitrogen, разведение 1:1000) и против GAPDH (2118, Cell Signaling Technology, разведение 1:1000). После отмывки в ТБСТ мембрану инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в растворе вторых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (антитела против мыши — A9044, Sigma-Aldrich, разведение 1:20000; антитела против кролика — A16096, Invitrogen, разведение 1:5000) на 5% молоке, а затем промывали ТБСТ. Меченые белки визуализировали с использованием хемилюминесцентного субстрата Clarity либо Clarity Max (Bio-Rad, США) с помощью системы визуализации ChemiDoc™ Touch.

13. Статистический анализ

Экспериментальные данные отображены либо в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD), либо как медиана \pm 25, 75-перцентили в зависимости от нормальности распределения данных. Для анализа использовались t-критерий

Стьюдента, U-критерий Манна–Уитни, а также многопараметрический анализ с применением критерия Краскела–Уоллиса с последующим тестом Данна для множественных сравнений. Все статистические расчёты проводились с помощью программы Prism GraphPad (GraphPad Software, США), при этом различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Глава 3. Оценка эффективности препарата на основе секретома МСК на модели токсического повреждения сперматогенеза у мышей

3.1. Валидация модели токсического повреждения сперматогенеза доксорубицином

В результате гистологического анализа установлено, что доза 1 мг/кг является минимальной для повреждения структуры семенных канальцев, спонтанное восстановление которых не происходит на длительном сроке (рис. 4). При введении меньших доз доксорубицина (0,25, 0,5 мг/кг) структура канальцев значимо не изменяется.

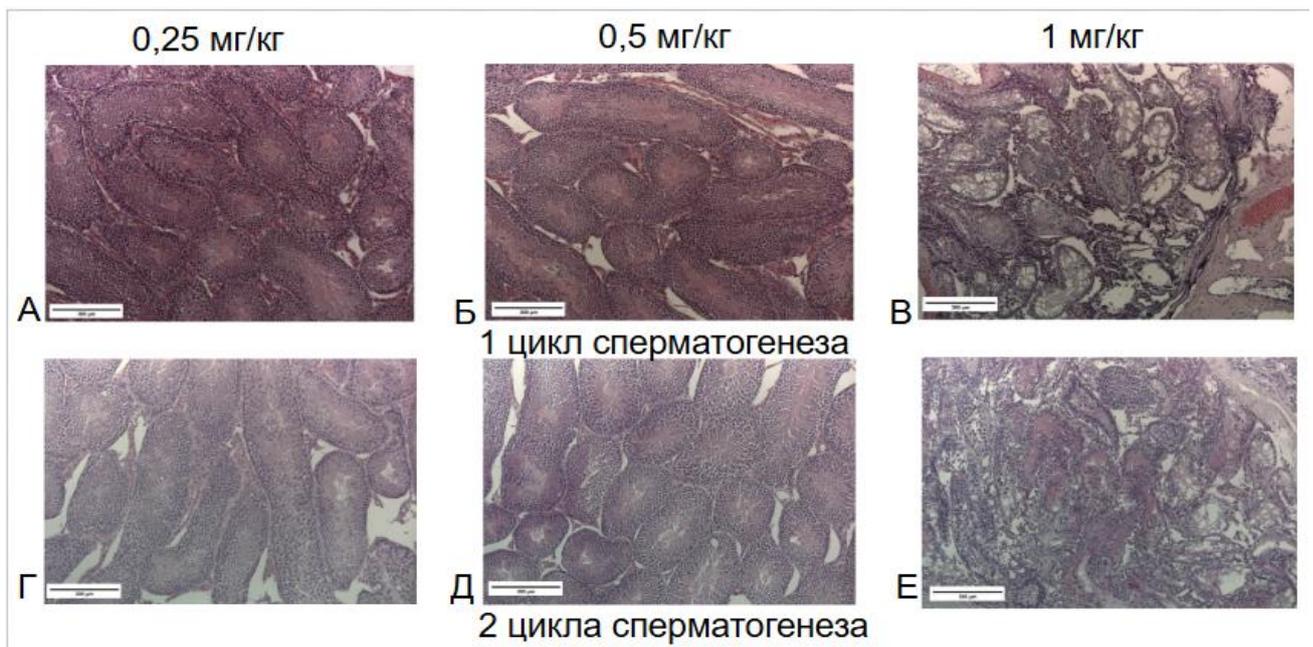


Рис. 4. Подбор повреждающей дозы доксорубицина. Гистологическая картина яичек мыши, окраска гематоксилином и эозином. Масштабная линейка отмечает 300 мкм. А-В — после 1 цикла сперматогенеза, Г-Е — после 2 циклов сперматогенеза. А, Г — после получения дозы доксорубицина 0,25 мг/кг, Б, Д — после получения дозы доксорубицина 0,5 мг/кг, В, Е — после получения дозы доксорубицина 1 мг/кг.

Таблица 14. Фертильность самцов, получавших разные дозы доксорубицина

Доза доксорубицина, мг/кг	Количество беременных самок
0,25	2/2
0,5	2/2
1,0	0/2

В результате изучения фертильности выявлено, что дозы 1 мг/кг достаточно для потери фертильности самцами мышей, что выражается в отсутствии беременности самок, как видно в таблице 14. Использование более высоких доз является нецелесообразным из-за увеличения побочных эффектов доксорубицина. Таким образом, был выбран режим введения в соответствии с клинической практикой — внутривбрюшинные инъекции 1 мг/кг 1 раз в 2 суток на протяжении 20 дней до достижения суммарной дозы 10 мг/кг.

3.2. Изучение ответа ниши сперматогониальной стволовой клетки на повреждение на модели токсического повреждения сперматогенеза доксорубицином

Показано, что на модели токсического повреждения с выбранным режимом введения доксорубицина семенные канальца самостоятельно не восстанавливаются даже на длительном сроке через 5 месяцев (рис. 5А).

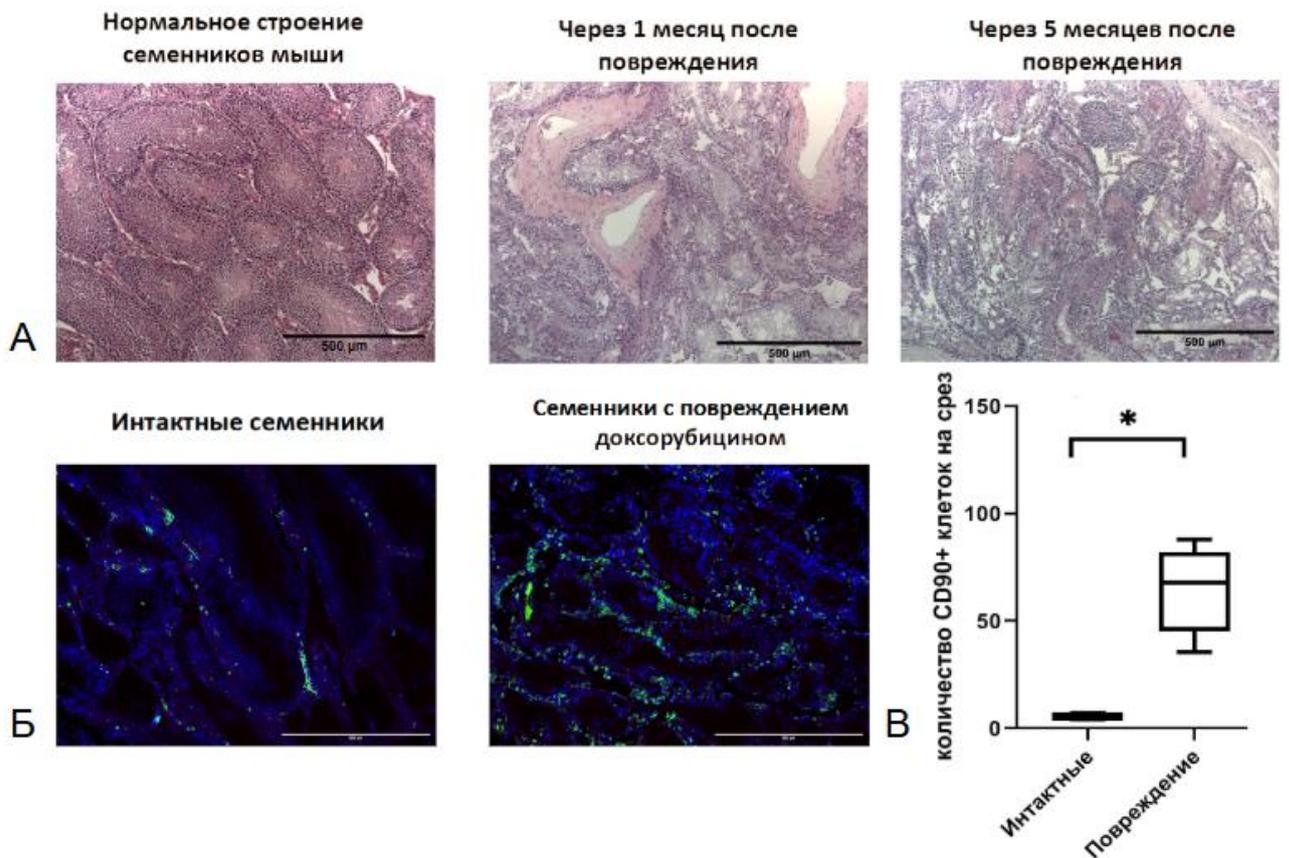


Рис. 5. Исследование ответа ниши ССК на повреждение сперматогенеза доксорубицином у мышей. А. Гистологическая картина интактных семенников мыши через 5 недель и 5 месяцев после инъекций доксорубицина, окраска гематоксилином и эозином. Масштабная линейка отмечает 500 мкм. Б. Иммуногистохимический анализ экспрессии маркера МСК CD90+ в семенниках мыши. Зелёный псевдоцвет — окраска CD90. Масштабный отрезок отмечает 200 мкм. В. Анализ содержания CD90+ МСК на семенной каналец на срезах семенников. Данные представлены как медиана и 25-й и 75-й перцентиль. * p < 0,05.

В результате токсического повреждения ниши ССК доксорубицином количество резидентных CD90+ МСК увеличивается, что, по-видимому, является компенсаторной реакцией на повреждение (рис. 5Б, 5В).

Однако многократное увеличение количества резидентных МСК не приводит к восстановлению ниши ССК, что указывает на возможное повреждение резидентных МСК доксорубицином. Можно предположить, что экзогенное введение здоровых МСК или продуктов их секреции может способствовать регенерации ниши ССК и восстановлению сперматогенеза.

3.3. Исследования эффективности *in vivo* препарата на основе секрета МСК на модели токсического повреждения доксорубицином у мышей

В предыдущих исследованиях было установлено, что препарат на основе секрета МСК приводит к восстановлению сперматогенеза на модели крипторхизма у крыс [114]. Однако используемая животная модель крипторхизма имеет физиологический характер и характеризуется частичной обратимостью, что обуславливает необходимость дополнительного исследования эффективности препарата на принципиально другой модели с тяжёлыми нарушениями сперматогенеза, например, токсического генеза с помощью введения доксорубицина. В качестве препарата сравнения использовали препарат токоферола ацетат.

На модели токсического повреждения сперматогенеза установлено, что введение препарата на основе секрета МСК через 5 недель не приводит к восстановлению семенных канальцев: количество повреждённых, восстанавливающихся и нормальных канальцев значимо не изменяется по сравнению с группой с повреждением без терапии (рис. 6).

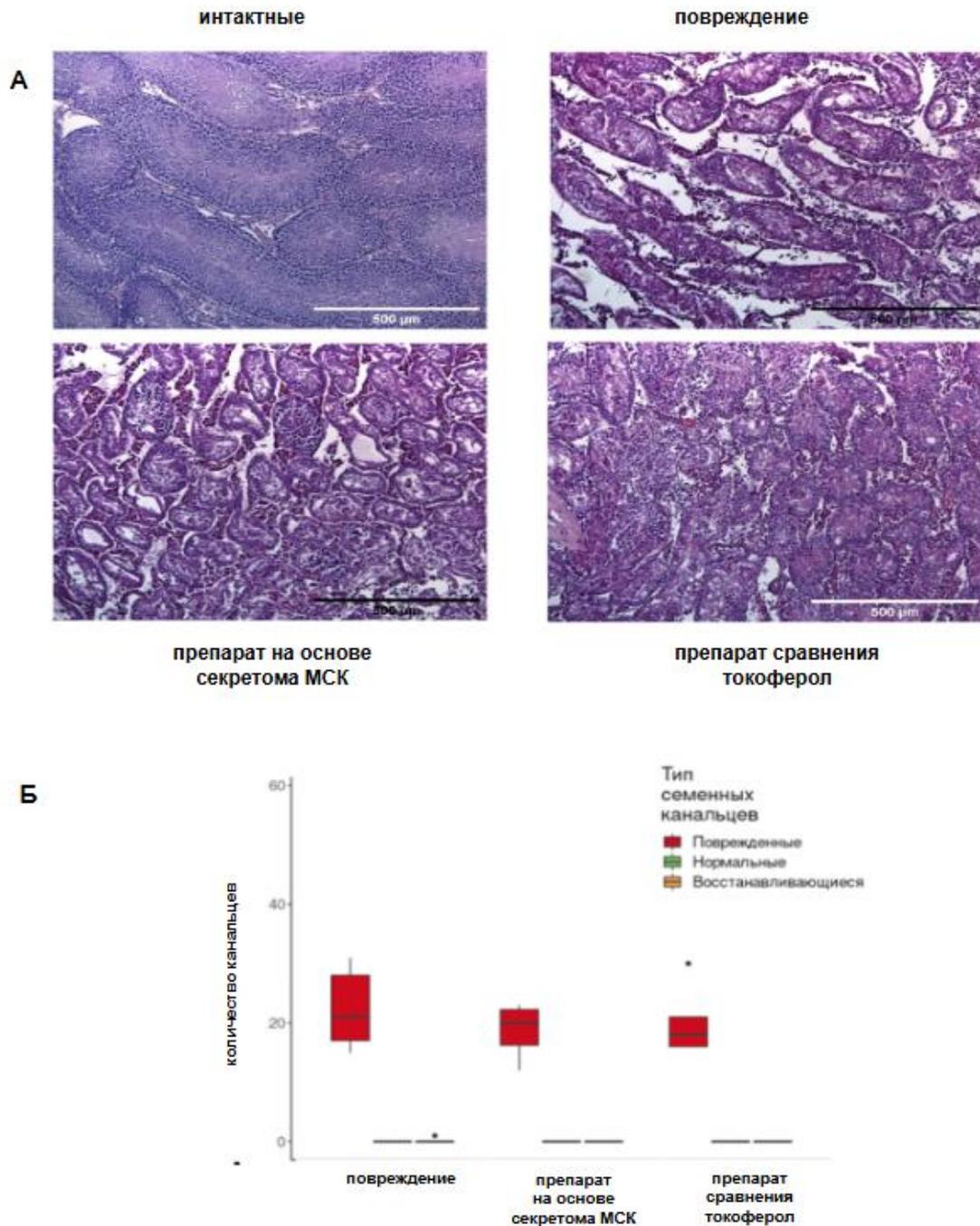


Рис. 6. Гистологическая картина семенных канальцев значительно не изменяется через 5 недель после введения препарата на основе секрета МСК на модели токсического повреждения сперматогенеза у мышей. А — Гистологическая картина яичек мыши через 5 недель, окраска гематоксилином и эозином. Масштабная линейка отмечает 500 мкм. Б — Количество повреждённых, нормальных и восстанавливающихся семенных канальцев на гистологических срезах яичек в пересчёте на одно животное после введения препарата на основе секрета МСК или препарата сравнения токоферола. Данные представлены как медиана и 25-й и 75-й процентиль. * $p < 0,05$.

Через 5 месяцев во всех группах появляются нормальные каналцы (рис. 7). У животных с введением препарата на основе секрета МСК наблюдается тенденция к увеличению числа нормальных каналцев по сравнению с другими группами, однако различия статистически не значимы.

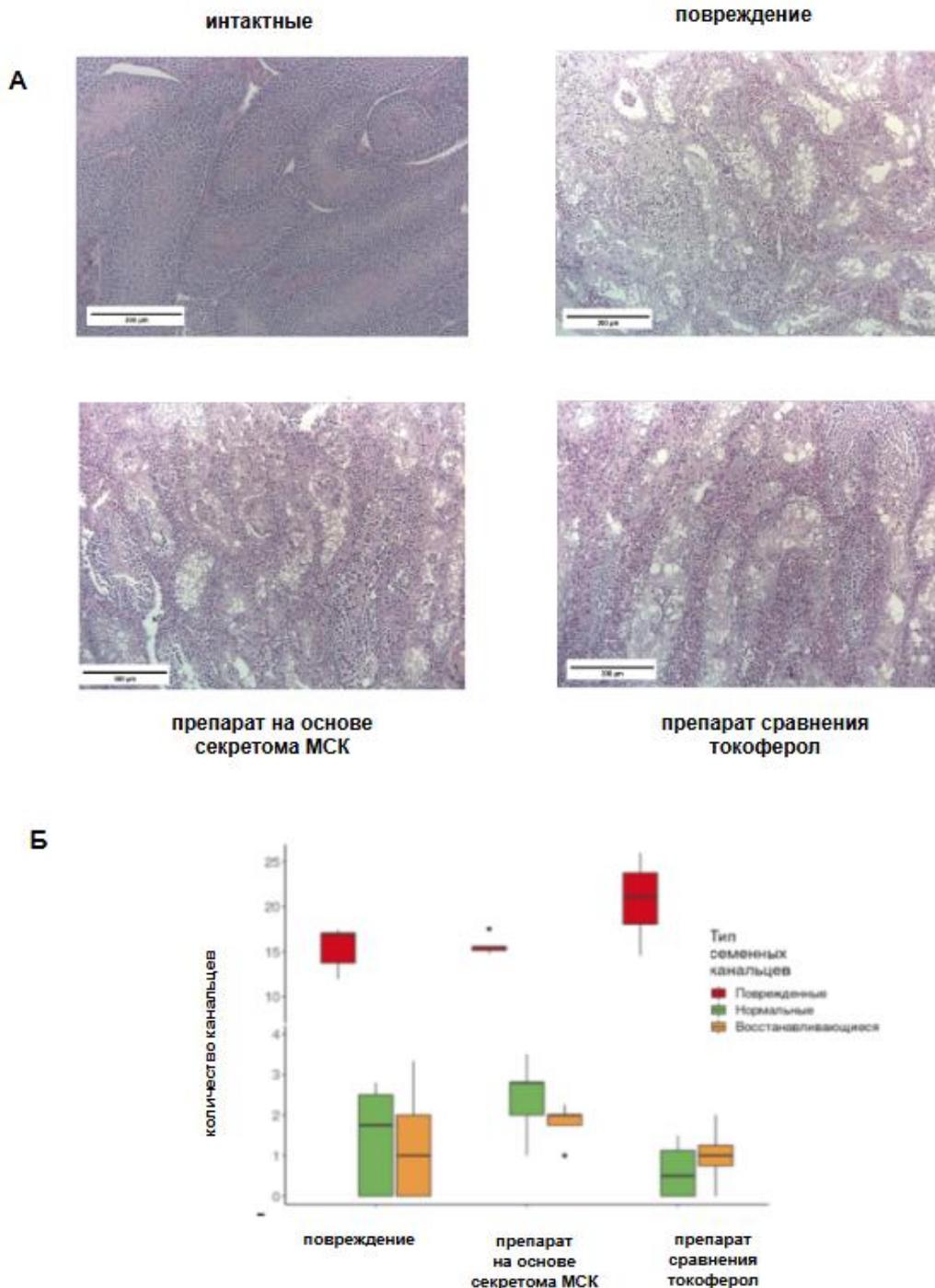


Рис. 7. Гистологическая картина показывает тенденцию к восстановлению семенных каналцев через 5 месяцев после введения препарата на основе секрета МСК. А — Гистологическая картина яичек мыши через 5 недель, окраска гематоксилином и эозином. Масштабная линейка отмечает 500 мкм. Б —

Количество повреждённых, нормальных и восстанавливающихся семенных канальцев на гистологических срезах яичек в пересчёте на одно животное после введения препарата на основе секрета МСК или препарата сравнения токоферола. Данные представлены как медиана и 25-й и 75-й процентиль. * $p < 0,05$.

Результаты морфометрического анализа содержимого придатков подтверждают гистологические данные, полученные через 5 недель: в группе с введением препарата на основе секрета МСК сперматогенез не восстанавливался. Однако через 5 месяцев у животных в группе с введением препарата на основе секрета МСК значительно увеличивалось общее число сперматозоидов и количество подвижных сперматозоидов (рис. 8), что показывает эффективность препарата на основе секрета МСК на данной модели.

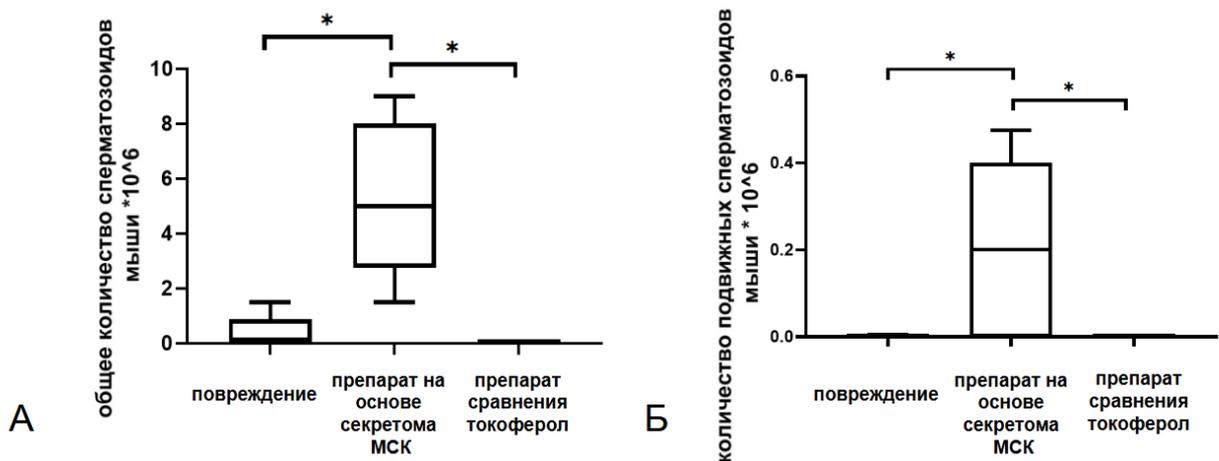


Рис. 8. Препарат на основе секрета МСК способствует восстановлению сперматогенеза через 5 месяцев после введения на модели токсического повреждения сперматогенеза у мышей.

А — Общее количество сперматозоидов* 10^6 , Б — Количество подвижных сперматозоидов* 10^6 на 1 мл гомогената через 5 месяцев после введения препарата на основе секрета МСК или препарата сравнения токоферола. Данные представлены как медиана и 25-й и 75-й процентиль. * $p < 0,05$.

Глава 4. Изучение механизмов действия препарата на основе секрета МСК в нише сперматогониальной стволовой клетки

4.1. Изучение клеточных механизмов действия препарата на основе секрета МСК *in vivo* на модели токсического повреждения сперматогенеза доксорубицином

Ниша ССК содержит семенные канальца, в которых по периферии располагаются ССК и клетки дифферона в окружении клеток Сертоли. ССК последовательно дифференцируются при продвижении к центру семенного канальца, в итоге превращаясь в сперматозоиды. Основными клетками интерстициального пространства между семенными канальцами являются клетки Лейдига, стромальные и иммунные клетки.

4.1.1. Влияние препарата на основе секрета МСК на клетки дифферона ССК

Иммуногистохимический анализ экспрессии PCNA показал, что количество активно пролиферирующих клеток сперматогенного дифферона, положительных по маркеру PCNA, снижается при повреждении ниши ССК. Однако при введении препарата на основе секрета МСК наблюдается тенденция к увеличению активно делящихся ССК, что может косвенно отражать процесс восстановления процесса сперматогенеза (рис. 9).

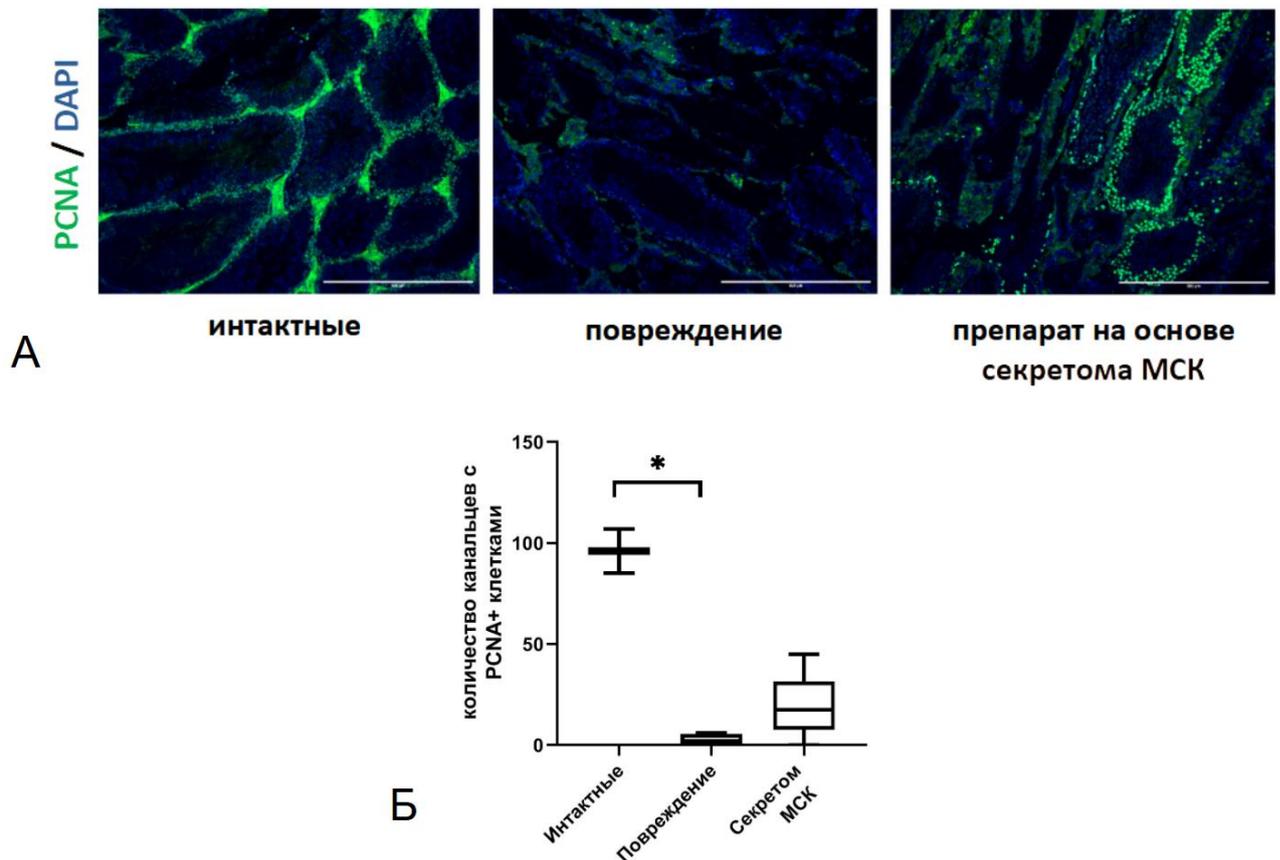


Рис. 9. Оценка влияния препарата на основе секретома МСК на количество клеток сперматогенного эпителия на модели токсического повреждения сперматогенеза у мышей. А. — Иммуногистохимический анализ экспрессии PCNA в семенниках мыши. Зелёный псевдоцвет — окраска PCNA. Масштабный отрезок отмечает 200 мкм. Б — Количество семенных канальцев с PCNA+ клетками. Результаты представлены как медиана и 25-й и 75-й процентиль. * $p < 0,05$.

4.1.2. Влияние препарата на основе секретома МСК на клетки Сертоли

Одними из основных поддерживающих клеток ниши ССК внутри семенных канальцев являются клетки Сертоли. Иммуногистохимическим анализом показано, что количество SOX9+ клеток Сертоли при повреждении компенсаторно увеличивается, возможно за счёт миграции из близлежащих областей [114]. Введение препарата на основе секретома МСК значимо не влияет на количество клеток Сертоли (рис. 10).

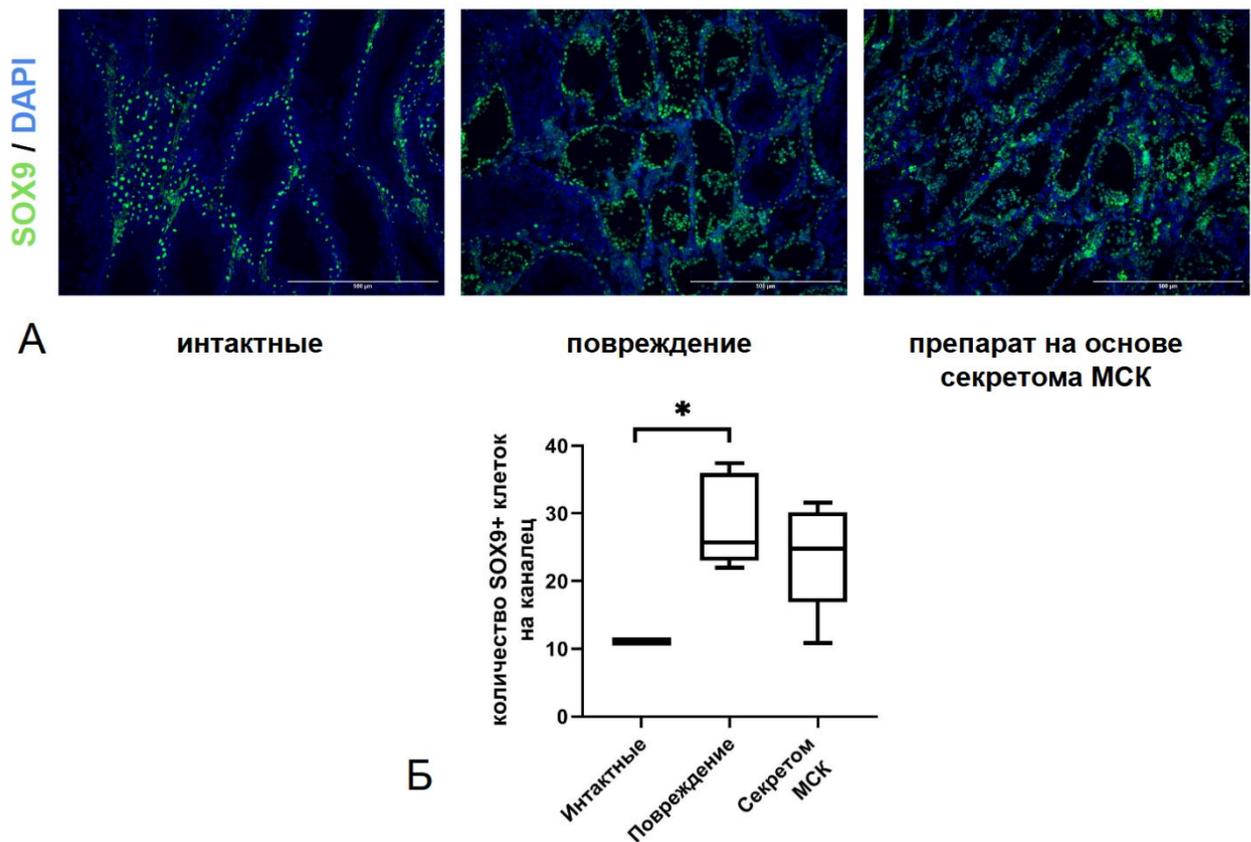


Рис. 10. Оценка влияния препарата на основе секретома МСК на количество клеток Сертоли на модели токсического повреждения сперматогенеза у мышей. А Иммуногистохимический анализ экспрессии маркера клеток Сертоли SOX9+ в семенниках мыши. Зелёный псевдоцвет — окраска SOX 9. Масштабный отрезок отмечает 200 мкм. Б. Количество SOX9+ клеток на каналец на срезах семенников. Данные представлены как медиана и 25-й и 75-й процентиль. * $p < 0,05$.

Таким образом, секретом МСК имеет только тенденцию к влиянию на основные клетки внутри семенных канальцев: ССК и клетки Сертоли. Изученные клетки, по-видимому, не являются основной мишенью препарата на основе секретома МСК.

4.1.3. Изучение биораспределения препарата на основе секретома МСК при локальном введении под белочную оболочку яичка в норме и при повреждении

Был проведён анализ локального биораспределения препарата на основе секретома МСК при введении под белочную оболочку яичка для определения

первичной клеточной мишени в семеннике. Поскольку секретом МСК сложно визуализировать, для оценки биораспределения был взят белковый флуоресцентный аналог — рекомбинантный GFP. В состав готовой лекарственной формы препарата на основе секрета МСК входят секретом МСК и свиной коллаген (объемное соотношение 1:4). Поэтому интактным мышам или мышам с токсическим нарушением сперматогенеза доксорубицином вводили коллаген или смесь коллагена с GFP. Было показано, что локализация препарата через час после введения происходит главным образом в интерстиции (рис. 11А-11Г).

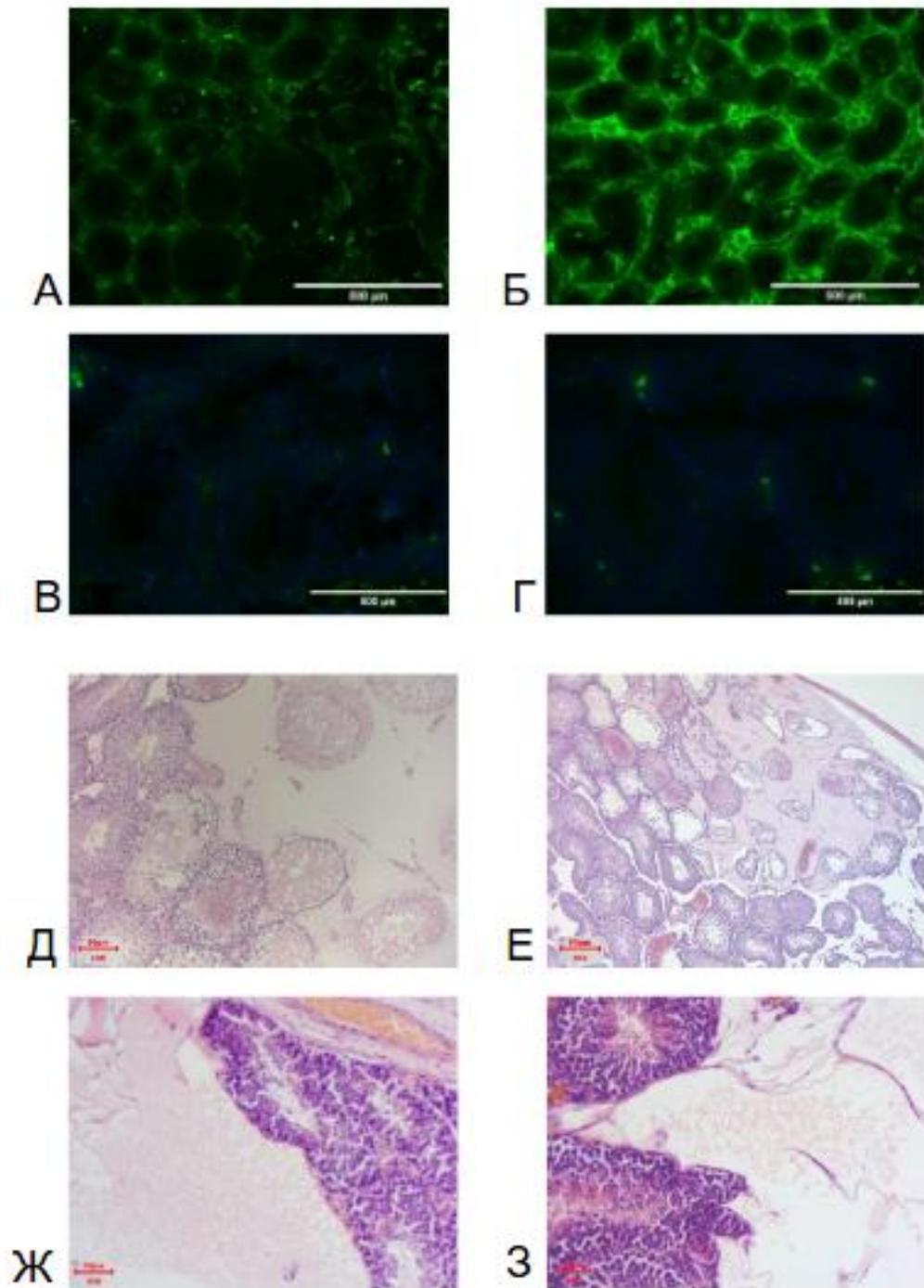


Рис. 11. Оценка биораспределения препарата на основе секретома МСК при локальном введении под белочную оболочку яичка мыши. А — инъекция коллагена животным с токсическим повреждением сперматогенеза; Б — инъекция комбинации коллаген + GFP животным с токсическим повреждением сперматогенеза; С — инъекция коллагена интактным животным; Д — инъекция комбинации коллаген + GFP интактным животным. DAPI (синий) мечены ядра клеток. Д-З — Гистологические препараты срезов семенников крыс (Д,Е) и кроликов (Ж,З) через 3 (Д), 14 (Е), 30 (Ж) и 60 (З) дней после введения коллагенового геля под белочную оболочку, окраска гематоксилином-эозином. Увеличение $\times 10$ (А-Г), $\times 20$ (Д), $\times 10$ (Е), $\times 200$ (Ж, З).

При введении свиного коллагена интратестикулярно крысам (однократно в объёме 100 мкл на семенник) и кроликам (двукратно в объёме 190 мкл на семенник) было показано, что вплоть до 60-го день эксперимента в месте введения наблюдаются полости между единичными канальцами, в которых, по-видимому, сохраняется коллаген (рис. 11Д-113). Распространения коллагена в другие тканевые компартменты не наблюдали. Таким образом, основная мишень секрета МСК может быть расположена в интерстиции. Поскольку в интерстиции находятся важные регуляторы сперматогенеза, главным образом, клетки Лейдига и макрофаги, они могут являться первичной клеточной мишенью секрета МСК.

4.1.4. Влияние препарата на основе секрета МСК на макрофаги

Для исследования секрета МСК на резидентные макрофаги ниши ССК мы проанализировали количество М2-макрофагов по маркерам CD163 и CD206. Установлено, что при повреждении количество М2-макрофагов значительно увеличивается по сравнению с семенниками интактными животными, введение секрета МСК значительно не влияло на их количество (рис. 12).

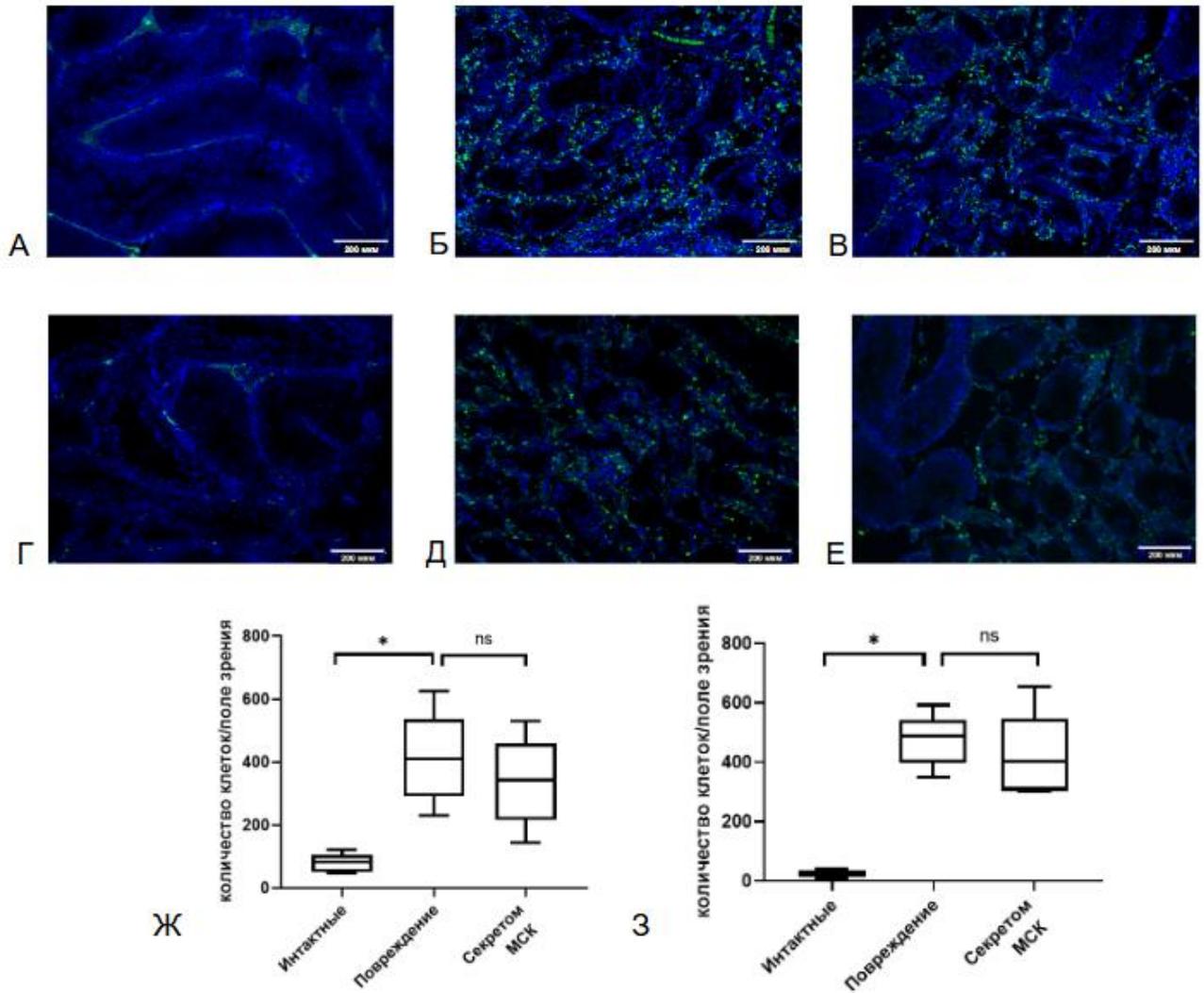


Рис. 12. Оценка влияния препарата на основе секрета МСК на число М2-макрофагов в интерстициальном пространстве семенников мышей. Срезы семенников через 5 месяцев после введения препарата на основе секрета МСК. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к маркёрам макрофагов CD206 и CD163. Синий псевдоцвет — DAPI; зелёный псевдоцвет – CD206+ и CD163+ М2-макрофаги. А-В CD206+ макрофаги преимущественно находятся в интерстиции. А — без манипуляций, группа “интактные”, Б — с токсическим повреждением, группа “повреждение”, В — с токсическим повреждением и введением препарата на основе секрета МСК, группа “секретом МСК”. Г-Е CD163+макрофаги преимущественно находятся в интерстиции. Г — без манипуляций, группа “интактные”, Д — с токсическим повреждением, группа “повреждение”, Е — с токсическим повреждением и введением препарата на основе секрета МСК, группа “секретом МСК”. Масштабный отрезок — 200 мкм. Ж — Количество CD163+ М2-макрофагов на поле зрения через 5 месяцев после введения секрета МСК. В каждой группе количество исследуемых семенников 6. Результаты представлены как медиана и 25-й и 75-й процентиль. З — Число CD206+ М2-

макрофагов на поле зрения через 5 месяцев после введения секрета МСК. В каждой группе количество исследуемых семенников 6. Результаты представлены как медиана и 25-й и 75-й процентиль.

Поскольку секретом МСК, по-видимому, не оказывает значимого влияния на макрофаги, первичной клеточной мишенью препарата на основе секрета МСК могут быть клетки Лейдига, которые составляют около 80% интерстиция.

4.2. Исследование действия секрета МСК на клетки Лейдига *in vitro*

Для оценки влияния секрета МСК *in vitro* клетки Лейдига грызунов были выделены в культуру. В эксперименте использовали два контроля, в которых с клеток Лейдига, культивируемых в пустой среде собирали среду на 2 (контроль 2 день) и 4 день (контроль 4 день). При этом в точке «контроль 2 день» концентрация тестостерона, секретиремого клетками Лейдига, выше, чем в точке «контроль 4 день». Это связано с тем, что при культивировании способность клеток Лейдига к продукции тестостерона значимо снижается.

Показано, что секретом МСК значимо стимулирует секрецию тестостерона клетками Лейдига относительно отрицательного контроля 4 дня и секрета стромальных клеток сравнения — фибробластов (рис. 13А), что говорит о специфичности действия. Данная модель была отвалидирована и легла в основу разработки показателя для стандартизации биологического препарата на основе секрета МСК — специфической активности.

На данной модели установлена дозозависимость эффекта: при увеличении концентрации секрета МСК увеличивается концентрация тестостерона, выделяемого клетками Лейдига. При этом при концентрировании секрета МСК больше, чем в 10 раз, эффект стремится выйти на плато (рис. 13Б).

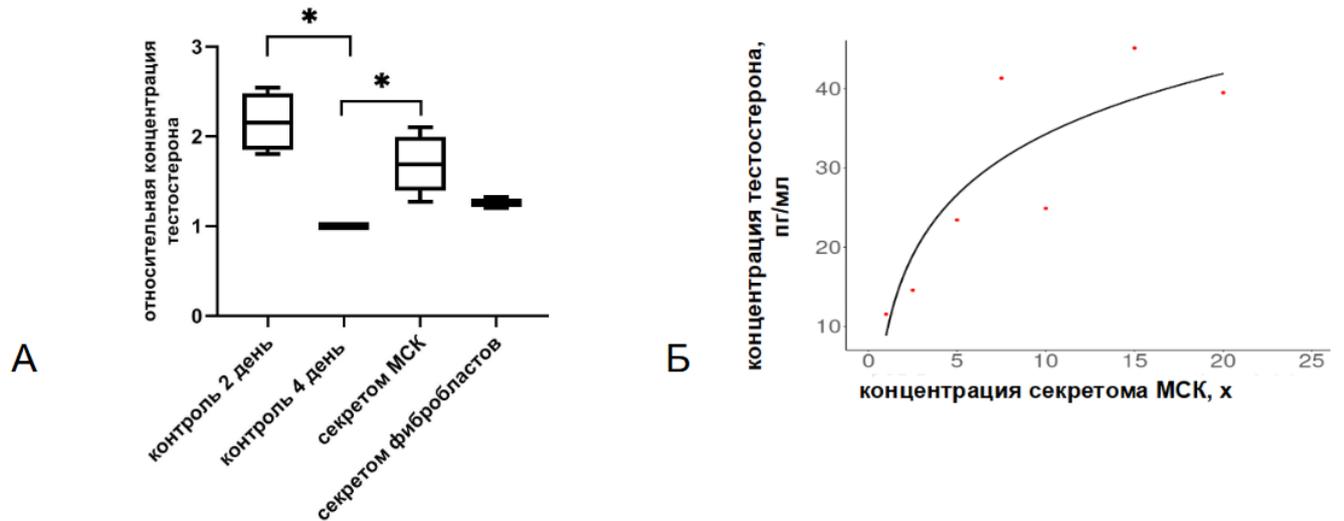


Рис. 13. Модель на клетках Лейдига для оценки эффективности препарата на основе секрета МСК *in vitro*. А — Секретом МСК стимулирует синтез тестостерона клетками Лейдига. На рисунке показана относительная концентрация тестостерона в среде клеток Лейдига (значения контроля 4 дня приняты за единицу). Данные представлены как среднее и стандартное отклонение. * $p < 0,05$. Б — Зависимость концентрации тестостерона в среде клеток Лейдига от степени концентрирования секрета МСК (x).

Глава 5. Выявление ключевых компонентов, опосредующих фармакологическую активность препарата на основе секрета МСК

5.1. Изучение фармакологического действия фракций секрета МСК

В составе секрета МСК можно выделить фракцию внеклеточных везикул и фракцию растворимых факторов (внеклеточная фракция). На модели токсического повреждения сперматогенеза *in vivo* и на модели на клетках Лейдига *in vitro* было показано, что основную роль в реализации данных эффектов секрета МСК могут играть растворимые факторы (рис. 14).

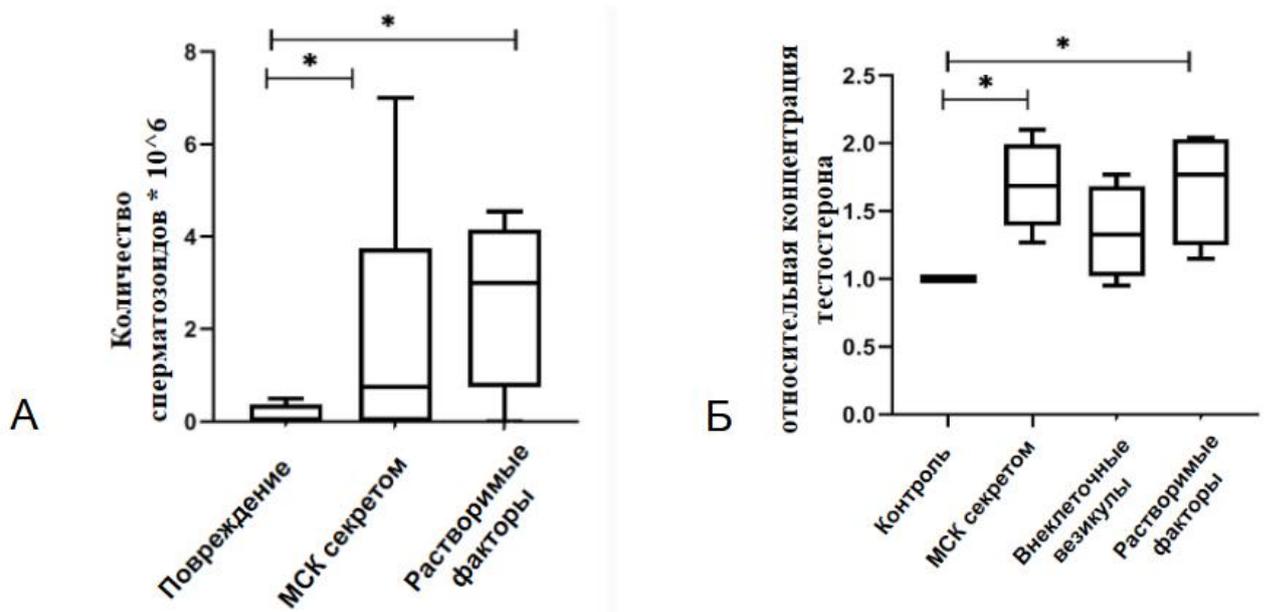


Рис. 14. Изучение вклада фракций секрета МСК в реализацию терапевтических эффектов. А — Оценка восстановления сперматогенеза после введения полной фракции секрета МСК или растворимых факторов. Общее количество сперматозоидов*10⁶ на 1 мл гомогената через 5 месяцев после введения. Результаты представлены как медиана и 25-й и 75-й процентиль. **p* < 0,05. Б — Сравнение эффектов полной фракции секрета МСК, растворимых факторов и внеклеточных везикул на клетки Лейдига. На рисунке показана относительная концентрация тестостерона в среде клеток Лейдига (значения контроля 4 дня приняты за единицу). Результаты представлены как медиана и 25-й и 75-й процентиль. * *p* < 0,05.

5.2. Выявление ключевых факторов, опосредующих фармакологическую активность секрета МСК *in vivo* на модели токсического повреждения сперматогенеза доксорубицином у мышей

Анализ литературы позволил предположить, что некоторые факторы, входящие в состав секрета МСК, например, GDNF, VEGF, CSF1, BMP4, FGF2, c-kit лиганд, микроРНК могут иметь регуляторную функцию в нише ССК. Ранее было показано, что эффект секрета МСК *in vivo* может опосредоваться фракцией растворимых факторов, которая, главным образом, представлена факторами роста. Наиболее высокопредставленными факторами в секрете МСК человека, зачастую участвующими в регенерации ниши, являются VEGF и GDNF. В связи с этим, на модели *in vivo* был оценён вклад этих факторов в составе секрета МСК в восстановление сперматогенеза. Ингибиторный анализ с использованием нейтрализующих антител позволил установить, что GDNF не вносит значимого вклада в восстановление сперматогенеза. В свою очередь, VEGF является критичным компонентом секрета МСК для восстановления количества сперматозоидов, что позволяет рассматривать его как суррогатный фактор, отражающий фармакологическую активность секрета МСК (рис. 15). На основании этого содержание VEGF учитывали при разработке показателей для стандартизации препарата на основе секрета МСК: подлинность и количественное определение.

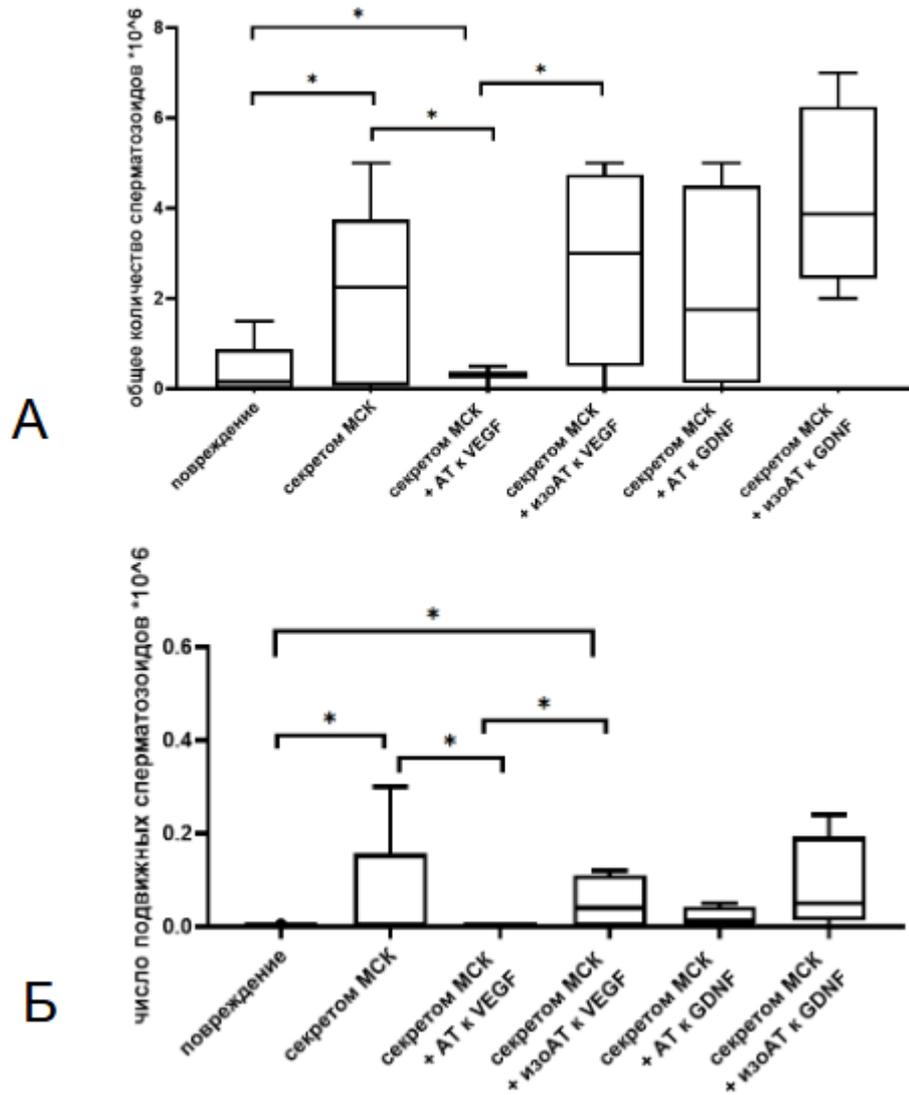


Рис. 15. Оценка вклада компонентов секрета МСК VEGF и GDNF в фармакологическую активность препарата на основе секрета МСК по восстановлению сперматогенеза. На рисунках отражено количество сперматозоидов $\cdot 10^6$ на 1 мл гомогената через 5 месяцев после инъекции препарата на основе секрета МСК. А — Общее количество сперматозоидов после введения препарата на основе секрета МСК или секрета МСК с блокирующими антителами к VEGF или GDNF, либо изотипическими антителами. Данные представлены в виде медианы и 25-го и 75-го перцентилей. Б — Количество подвижных сперматозоидов после введения препарата на основе секрета МСК или секрета МСК с блокирующими антителами к VEGF или GDNF, либо изотипическими антителами. Данные представлены в виде медианы и 25-го и 75-го перцентилей. * $p < 0,05$.

5.3 Выявление ключевых факторов, опосредующих способность секрета МСК стимулировать секрецию тестостерона клетками Лейдига *in vitro*

5.3.1. Изучение вклада VEGF в составе секрета МСК в стимуляцию секреторной активности клеток Лейдига

Ранее было показано, что VEGF в составе секрета МСК важен для восстановления сперматогенеза. Из данных литературы известно, что VEGF является критическим регулятором роста сосудов. Однако в предыдущих работах было установлено, что секретом МСК не влияет на количество сосудов в семеннике в ходе восстановления после повреждения [5]. Возможной клеточной мишенью VEGF может быть первичная мишень секрета МСК — клетки Лейдига. Было показано, что концентрация секретируемого клетками Лейдига тестостерона зависит от содержания VEGF в секрете МСК. Однако при блокировании нейтрализующими антителами VEGF наблюдается лишь тенденция к снижению эффекта секрета МСК на клетках Лейдига (рис. 16А). Однако была установлена возможность действия VEGF на клетки Лейдига, поскольку показано присутствие рецептора VEGF 2 типа (VEGFR2) на клетках Лейдига (рис. 16В). Дальнейшее блокирование антителами VEGFR2 на клетках Лейдига привело к выраженной тенденции снижения эффекта секрета МСК: концентрация тестостерона была ниже по сравнению с концентрацией после нанесения секрета МСК на клетки Лейдига (рис. 16Б). Это может указывать на возможную вовлечённость VEGFR2 в реализацию эффекта секрета МСК на клетках Лейдига.

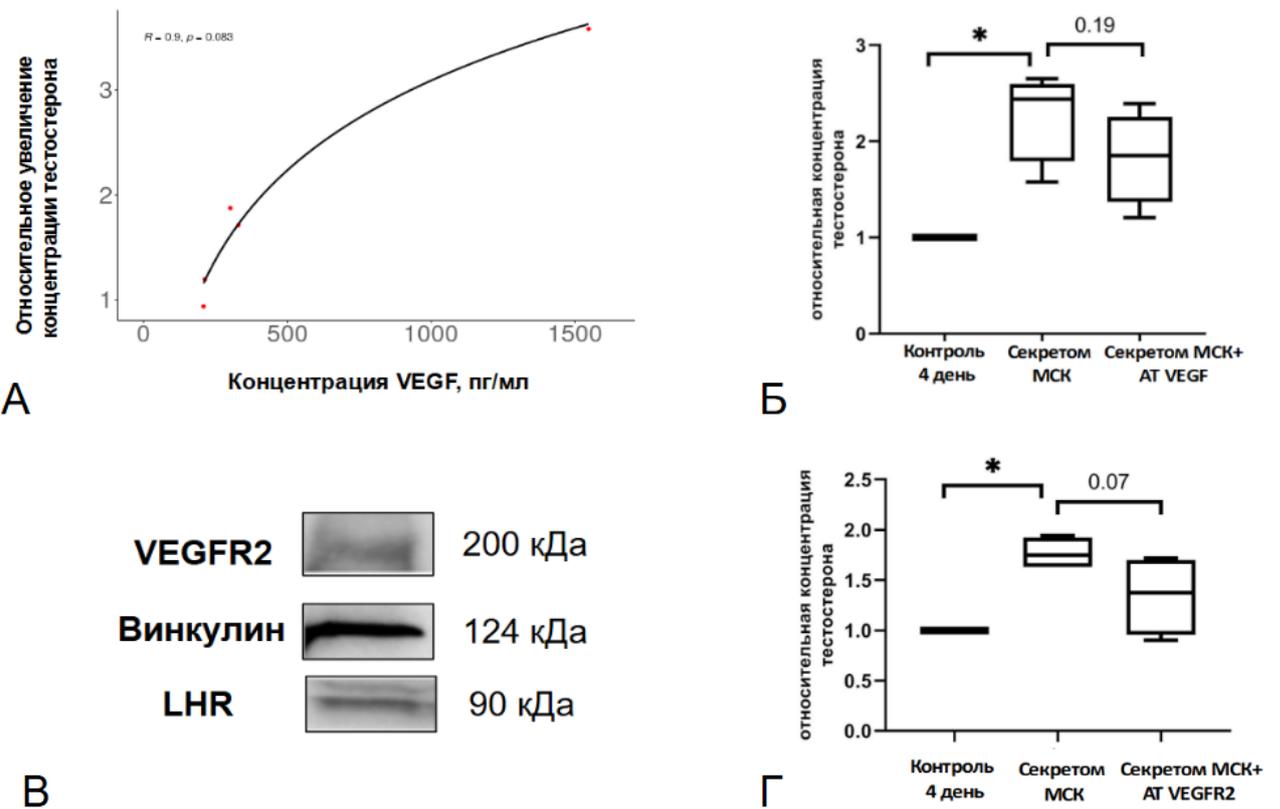


Рис. 16. Оценка вклада VEGF в составе секрета МСК в стимуляцию стероидогенеза клетками Лейдига. А — Корреляция уровня секреции тестостерона клетками Лейдига, от содержания VEGF в секрете МСК, который добавляют к клеткам Лейдига. Б — Относительная концентрация тестостерона в среде клеток Лейдига после добавления секрета МСК или секрета МСК с нейтрализующими антителами VEGF к клеткам Лейдига (значения контроля 4 дня приняты за единицу). Результаты представлены как медиана и 25-й и 75-й проценты. * $p < 0,05$. В — Вестерн-блоттинг для анализа наличия VEGFR2 и LHR в качестве положительного контроля в лизате клеток Лейдига. Г — Относительная концентрация тестостерона в среде клеток Лейдига после добавления секрета МСК к интактным клеткам Лейдига или к клеткам Лейдига с заблокированным рецептором VEGFR2 (значения контроля 4 дня приняты за единицу). Результаты представлены как медиана и 25-й и 75-й проценты. * $p < 0,05$.

5.3.2. Изучение вклада микроРНК в составе секрета МСК в стимуляцию секреторной активности клеток Лейдига

При нейтрализации VEGF или его рецептора наблюдается тенденция к снижению эффекта секрета МСК на клетки Лейдига. Поскольку эффект значительно не снижается, то было предположено, что в составе секрета МСК есть другие факторы, опосредующие действие секрета МСК.

Как было показано ранее, в состав секрета МСК, помимо факторов роста, входят регуляторные РНК, включая микроРНК. Одной из самых представленных микроРНК в составе секрета МСК является микроРНК-21. Кроме того, другими авторами была показана возможная роль микроРНК-21 в стероидогенезе в ооцитах [29]. В связи с этим, мы изучили роль микроРНК-21 в составе секрета МСК в стимуляции клеток Лейдига. Блокирование микроРНК-21 в секрете МСК приводит к снижению эффекта секрета МСК на клетках Лейдига (рис. 17Б). Добавление к клеткам Лейдига микроРНК-21 значительно стимулирует продукцию тестостерона клетками Лейдига (рис. 17В). Таким образом, микроРНК-21, по-видимому, является критическим компонентом секрета МСК для реализации влияния на клетки Лейдига.

Считается, что микроРНК содержатся во внеклеточных везикулах в секрете МСК. Однако в данной работе было показано наличие микроРНК-21 во вневезикулярной фракции (фракции растворимых факторов), которая, как было показано ранее, может вносить ключевой вклад в реализацию действия секрета МСК. (рис. 17А).

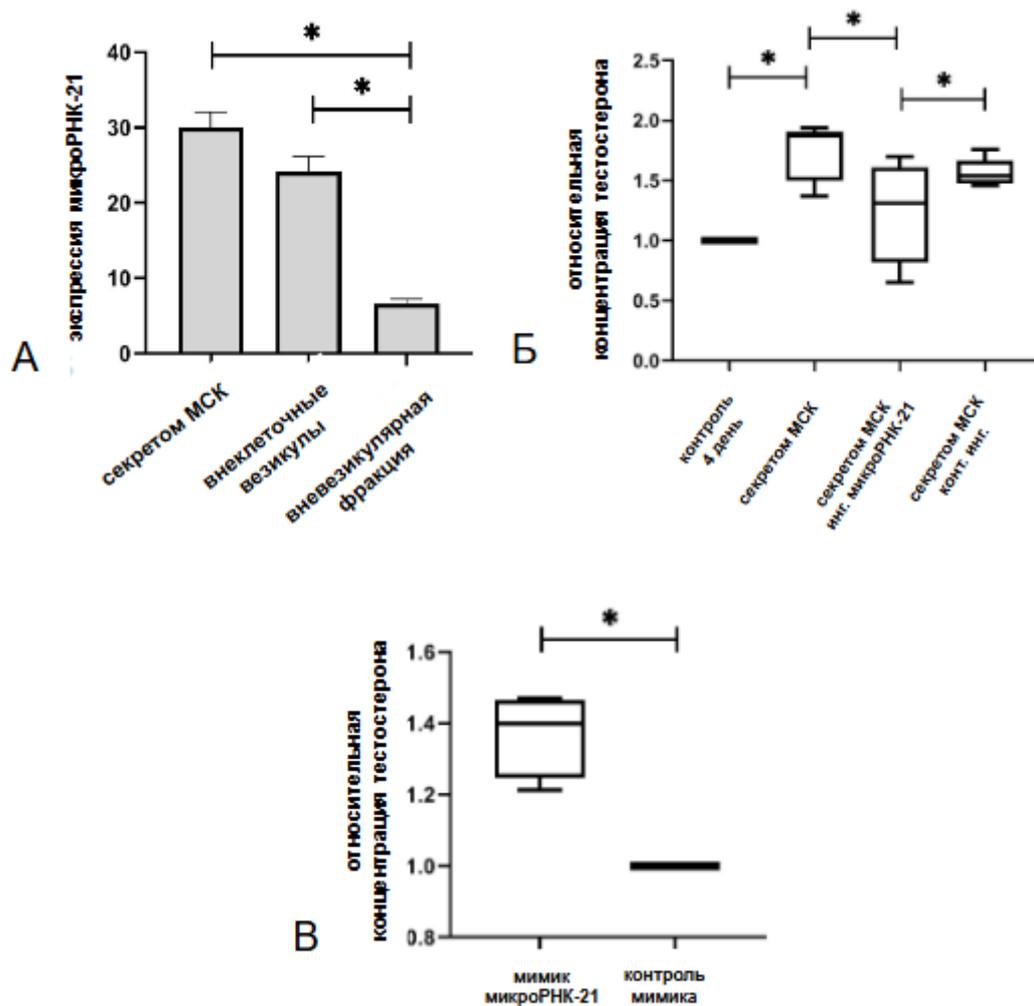


Рис. 17. Оценка вклада микроРНК-21 в составе секретома МСК в стимуляцию стероидогенеза клетками Лейдига. А — Относительное содержание микроРНК-21 в секретома МСК или во фракциях секретома МСК: везикулярной и вневезикулярной фракции, измеренное с помощью ПЦР в реальном времени. Количественные данные представлены как среднее и стандартное отклонение. * - $p < 0,05$. $N=3$. Б — Относительная концентрация тестостерона в среде клеток Лейдига (значения контроля 4 дня приняты за единицу) после добавления секретома МСК, секретома МСК с ингибитором микроРНК-21 или секретома МСК с ингибиторными контрольными олигонуклеотидами, данные представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей. * - $p < 0,05$. $N=5$. В. Относительная концентрация тестостерона в среде клеток Лейдига, трансфицированных мимиком микроРНК-21 или контрольными олигонуклеотидами (отрицательный контроль). данные представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей. * - $p < 0,05$. $N=5$.

Таким образом, можно предположить, что фракция растворимых факторов вносит больший эффект в реализацию эффектов секретома МСК *in vitro* и *in vivo*.

При этом, значимыми факторами могут быть VEGF и микроРНК-21. Однако, при удалении той или иной фракции или конкретного фактора эффекты секрета МСК не ингибируются полностью, что может говорить о принципиальности использования полной фракции секрета МСК для достижения суммарного фармакологического эффекта.

5.3.3. Изучение аспектов внутриклеточного сигналинга в клетках Лейдига, индуцируемого секретом МСК

Анализ возможных мажорных путей внутриклеточного сигналинга позволил установить значимый вклад ERK/pERK, но не Src/pSrc сигнального пути в стимуляции стероидогенеза в клетках Лейдига под влиянием секрета МСК (рис. 18).

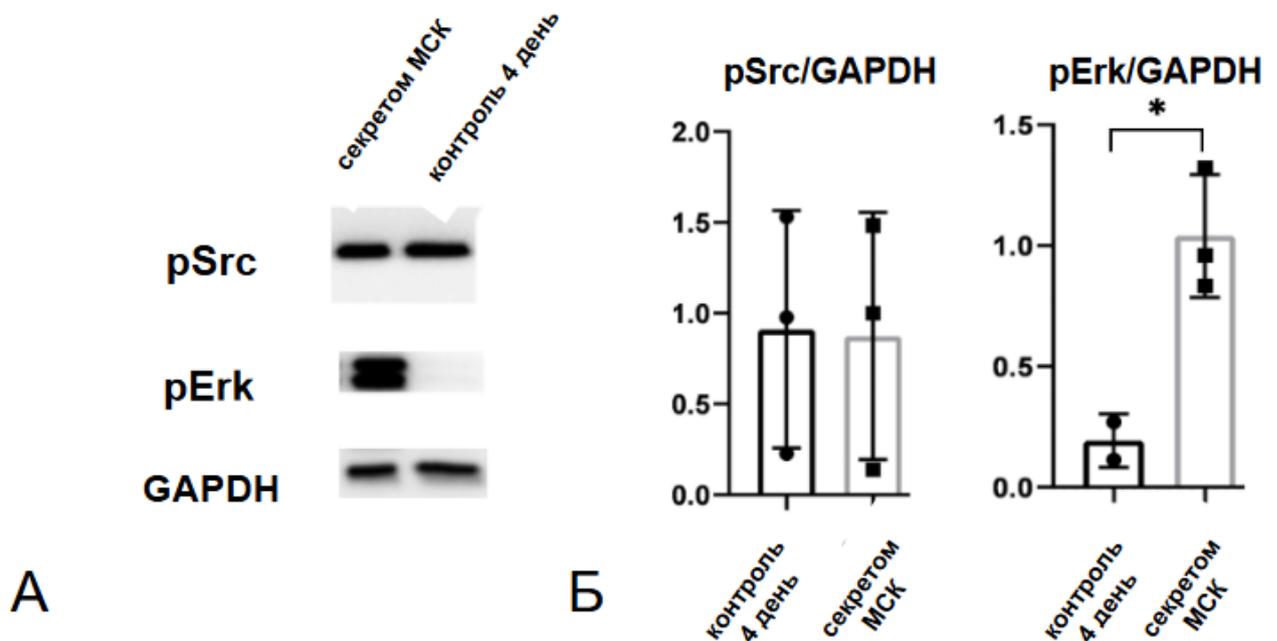


Рис. 18. Оценка активации основных внутриклеточных сигнальных путей в клетках Лейдига при добавлении секрета МСК. А — Вестерн-блоттинг, pSrc и pERK, N=3. Б — Относительные единицы значений вестерн-блоттинга на pSrc и pERK, N=3. данные представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей.

В результате биоинформатического поиска были выявлены возможные внутриклеточные мишени микроРНК-21 при регуляции стероидогенеза в клетках Лейдига, яичниках и коре надпочечников. Среди них обнаружены индукторы ферментов стероидогенеза, такие как STAT3, HIPK3, PITX2, ABCA1, ALDH1A1, HGF, а также ингибиторы ферментов стероидогенеза — ILR-6, TLR4, LIFR, Lats 1, VMPR2, FOXO3, как показано в таблице 15. Однако вовлечённость данных факторов в стероидогенез в клетках Лейдига требует дальнейшего изучения. Несмотря на наличие мишеней, антагонистичных по функции, суммарный эффект микроРНК-21 проявляется в стимуляции стероидогенеза клетками Лейдига, как было показано ранее.

Таблица 15. Анализ влияния мишеней микроРНК-21 на участников стероидогенеза в клетках Лейдига, яичниках и коре надпочечников

Фактор	Основная функция	Возможный путь	Влияние на участников стероидогенез	Влияние на стероидогенез
STAT3	Фактор транскрипции	Не известен	Увеличение экспрессии StAR и CYP11A1	Стимулирует [74]
HPK3	Киназа	Фосфорилирует транскрипционный фактор NR5A → активация SF1 (фактора стероидогенеза 1) → активация цАМФ сигналинга	Увеличение экспрессии StAR и CYP11A1	Стимулирует [76]
PITX2	Фактор транскрипции	Не известен	Не известно	Стимулирует [50]
ABCA1	АТФаза	Не известен	Способствует перераспределению липидов в клетки Лейдига	Стимулирует [23, 156]
ALDH1A1	Дегидрогеназа	Не известен	Не известно	Стимулирует [47]
HGF	Фактор роста	Не известен	Не известно	Стимулирует [39, 154]
ILR-6	Рецептор	Не известен	Снижение экспрессии StAR	Ингибирует [118, 119]
TLR4	Рецептор	Не известен	Не известно	Ингибирует [125]
LIFR	Рецептор	Не известен	Не известно	Ингибирует [37]
Lats 1	Киназа	Не известен	Снижение экспрессии StAR и CYP11A1	Ингибирует [102]
BMPR2	Рецептор	Не известен	Не известно	Ингибирует [149, 150]
FOXO3	Фактор транскрипции	Не известен	Не известно	Ингибирует [31]

В большинстве случаев можно установить влияние фактора на стероидогенез на уровне проявления конечного эффекта, например, увеличения или снижения синтеза тестостерона. При этом большинство промежуточных путей остаются неизвестными, что требует дальнейших исследований.

Глава 6. Изучение безопасности препарата на основе секретома МСК

6.1. Исследование общей токсичности препарата на основе секретома МСК на грызунах

После введения препарата на основе секретома МСК случаев интоксикации животных и гибели не наблюдали. Клинически значимых отклонений во всех группах при анализе показателей массы животных, потребления воды и корма, индивидуального поведения самцов, общего анализа мочи, гематологических показателей и биохимических показателей крови не зарегистрировано (приложение 1).

Единичные изменения у животных при однократном и многократном введении препарата на основе секретома МСК будут описаны далее.

6.1.1. Общая токсичность при однократном локальном введении крысам под белочную оболочку яичка

У единичных самцов, получающих препарат на основе секретома МСК или контрольное вещество (среда ДМЕМ с низкой концентрацией глюкозы 1 г/л), при патоморфологическом исследовании обнаружили некроз гепатоцитов и воспалительную инфильтрацию в печени и нефропатию. У одного самца в отсроченном периоде обнаружили воспалительную инфильтрацию в предстательной железе. Поскольку похожие изменения выявлены в группе контрольного вещества, они были отнесены к спонтанным, не связанным с введением исследуемого препарата.

6.1.2. Общая токсичность при многократном внутримышечном введении грызунам

При многократном внутримышечном введении препарата на основе секретома МСК регистрировали изменение в поведении: наблюдалась тенденция к снижению количества посещенных квадратов, которая достигла статистической значимости в дозе, в 2,5 раза превышающей терапевтическую дозу (рис. 19А).

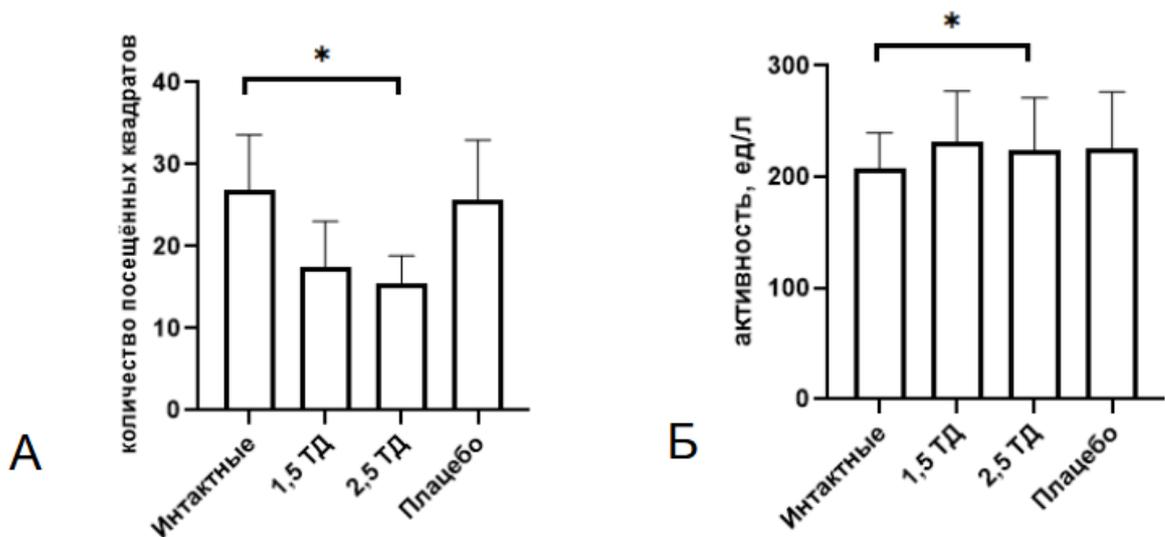


Рис. 19. Оценка общей токсичности препарата на основе секретомы МСК на крысах при многократном внутримышечном введении в дозах 1,5 ТД и 2,5 ТД. А — Количество посещённых квадратов в тесте «Открытое поле» в отсроченном периоде. Б — Активность щелочной фосфатазы на 14-й день эксперимента. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения. * $p < 0,05$.

При биохимическом анализе крови выявлена тенденция к увеличению активности щелочной фосфатазы в группе с введением препарата на основе секретомы МСК или контрольного вещества. Статистическая значимость по данному показателю была достигнута у животных, получавших препарат в дозе в 2,5 раза превышающей терапевтическую, в сравнении с интактными животными, однако в отсроченном периоде значения щелочной фосфатазы нормализовались (рис. 19Б).

6.1.3. Местная переносимость у крыс при локальном введении под белочную оболочку яичка

Секретом МСК и контрольное вещество при однократном локальном введении под белочную оболочку яичка оказали умеренное местно-раздражающее действие: наблюдали атрофию эпителия и застой спермы в семенных канальцах. У некоторых животных наблюдали дегенеративные изменения эпителия с деформированными клетками Сертоли и мелкими очагами обызвествления. Однако

патологические изменения регистрировали лишь в единичных семенных канальцах (рис. 19).

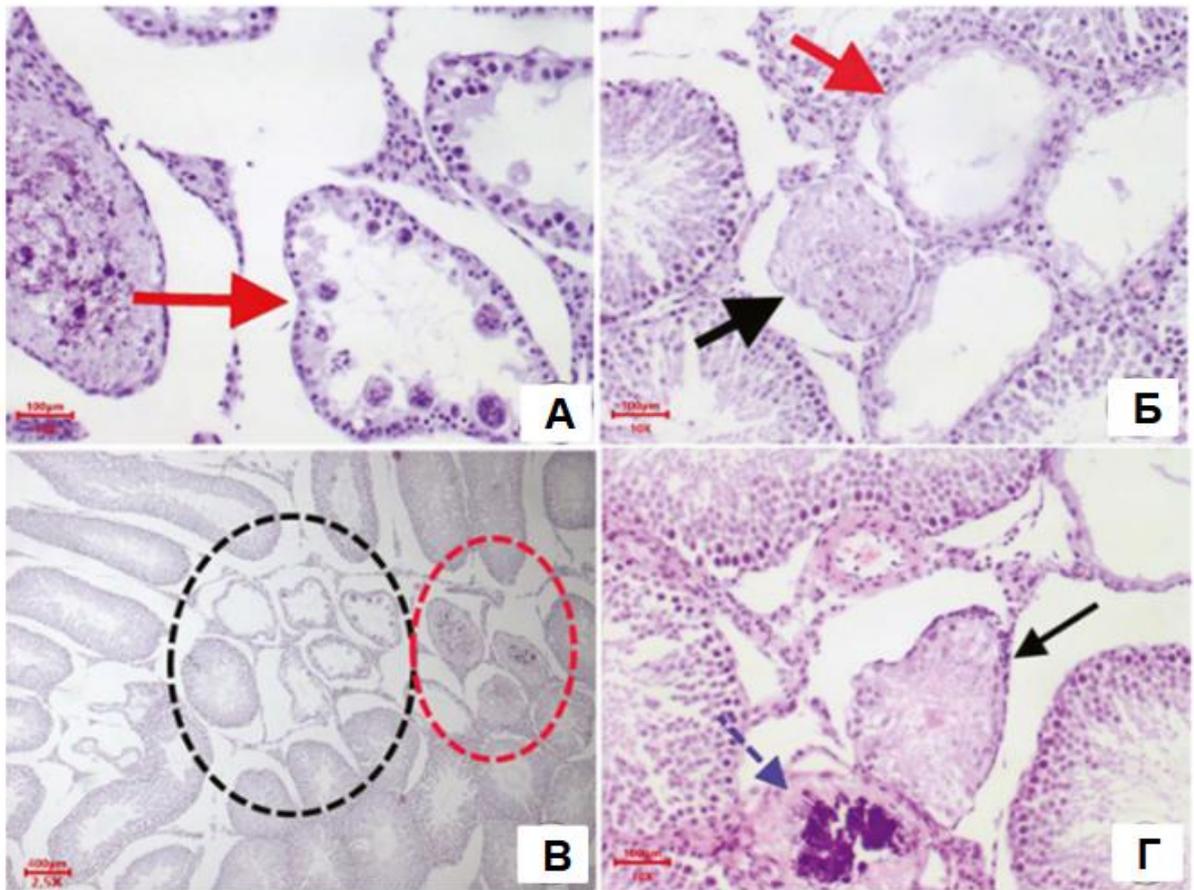


Рис. 19. Изучение влияния препарата на основе секрета МСК при однократном локальном введении под белочную оболочку яйца самцам крыс. На рисунках представлены срезы семенников самцов крыс на 14 сут эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. (А) красной стрелкой отмечен каналец с дегенеративными изменениями эпителия и с деформированными клетками Сертоли. (Б) красной стрелкой отмечен каналец с атрофическими изменениями эпителия, черной — семенной каналец с застоем спермы. (В) Черным овалом отмечены каналцы с дегенеративными изменениями эпителия и с деформированными клетками Сертоли, красным — каналцы с застоем спермы и с мелкими очагами обызвествления. (Г) черной стрелкой отмечен каналец с атрофическими изменениями эпителия, синей — обызвествление каналца.

6.2. Исследование общей безопасности препарата на основе секрета МСК на кроликах

6.2.1. Общая токсичность при двукратном локальном введении кроликам под белочную оболочку яичка

Случаев гибели и интоксикации животных после введения препарата на основе секрета МСК не зарегистрировано.

Значения протромбинового времени на 3-й день эксперимента, в группах, получавших тестируемый препарат в дозе 1,5 и 2,5 ТД, оказались статистически значимо ниже интактной группы и ниже значений референсного интервала. По окончании периода отсроченного наблюдения снижение протромбинового времени ниже значений референсного интервала отмечалось только в группе, получающих плацебо (вода для инъекций с коллагеном). У животных из группы плацебо были выявлены обратимые гистологические изменения в пузырьковидной железе по окончании периода введения (рис. 20).

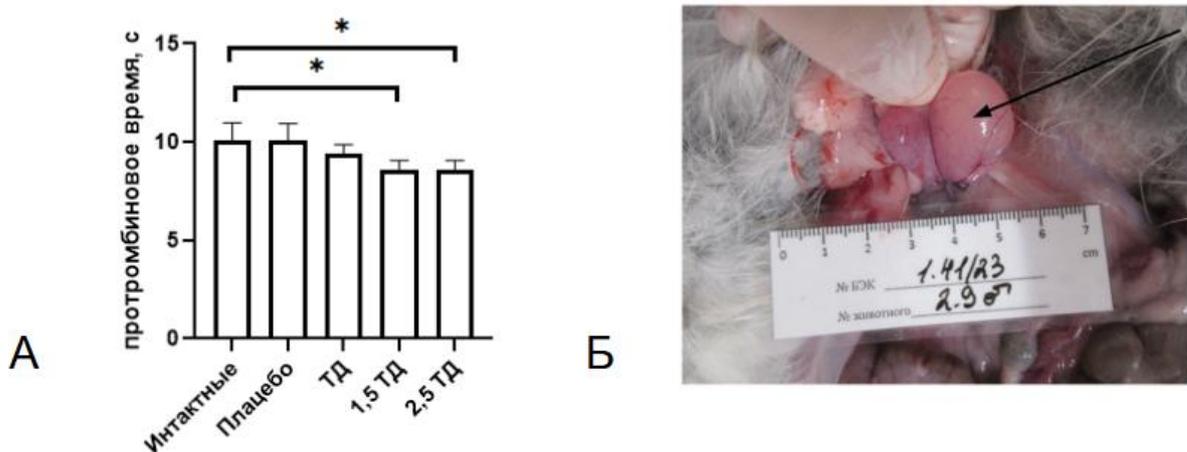


Рис. 20. Оценка общетоксического эффекта препарата на основе секрета МСК на кроликах при многократном введении в дозах ТД, 1,5 ТД и 2,5 ТД. А — Протромбиновое время в секундах. Данные представлены как среднее и стандартное отклонение. * $p < 0,05$. Б — Вскрытая брюшная полость самца кролика: черная стрелка — увеличенные пузырьковидные железы кролика.

По результатам оценки фармакологической безопасности установлено отсутствие влияния тестируемого препарата в отношении сердечно-сосудистой, дыхательной и в отношении центральной нервной систем. Нефротоксичность тестируемых препаратов отсутствует. Также показано отсутствие влияния на компоненты иммунной системы и отсутствие пирогенности (приложение 2).

6.2.2. Местная переносимость у кроликов при локальном введении под белочную оболочку яичка

У единичных животных из группы плацебо выявлено увеличение в размерах пузырьковидных желез, дольки которых были резко расширены и содержали прозрачный секрет, предположительно коллаген, свободно вытекающий при разрезе.

У нескольких животных, получивших инъекцию препарата или плацебо наблюдали участки значительного расслоения соединительнотканых перегородок с формированием полости, заполненной «рыхлым» веществом, предположительно коллагеном, с выраженным эозинофильным окрашиванием. При этом каналцы вдоль стенки полости деформированы в результате сдавливания, но без признаков дистрофических нарушений сперматогенного эпителия (рис. 21).

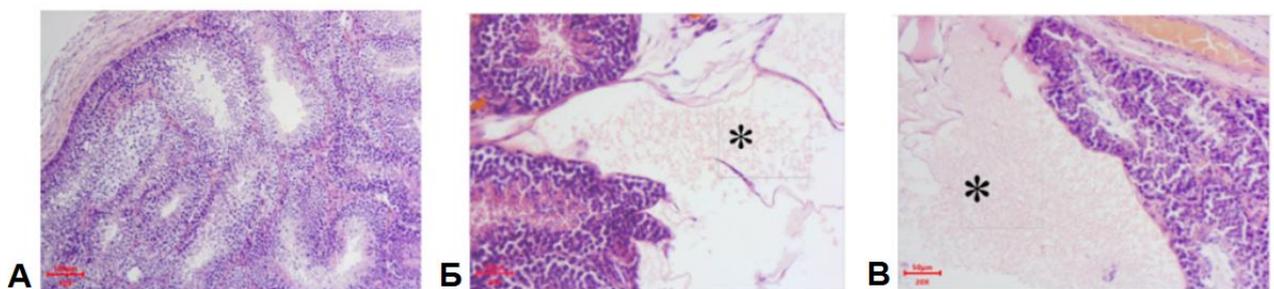


Рис. 21. Изучение влияния препарата на основе секретома МСК при локальном введении под белочную оболочку яичка самцам кроликов. Срезы органов репродуктивной системы кроликов, окраска гематоксилином и эозином. А — нормальное строение семенника кролика. Увеличение 100×. Б — место введения 1,5 ТД препарата на основе секретома МСК в семенник кролика. Увеличение 200×. В — место введения плацебо в семенник кролика. Увеличение 200×. На фотографиях В и С видна полость (*) в области белочной оболочки, стенками

которой являются соединительнотканые прослойки семенных канальцев, в просвете полости определяется зернистая эозинофильно окрашенная субстанция, которая визуальнo раздвигает канальца в стороны.

6.3. Исследование специфических видов токсичности препарата на основе секрета МСК

6.3.1. Изучение иммунотоксичности на мышах

Неспецифический иммунный ответ характеризовался увеличением фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов в дозах 1,5 и 2,5 ТД (рис. 22). Данный эффект может быть обусловлен реакцией иммунной системы мышей на введение человеческих факторов и является следствием видоспецифичности. Токсического действия на неспецифический иммунный ответ не наблюдали. Препарат на основе секрета МСК не оказывал влияния на гуморальный и клеточный иммунитет.

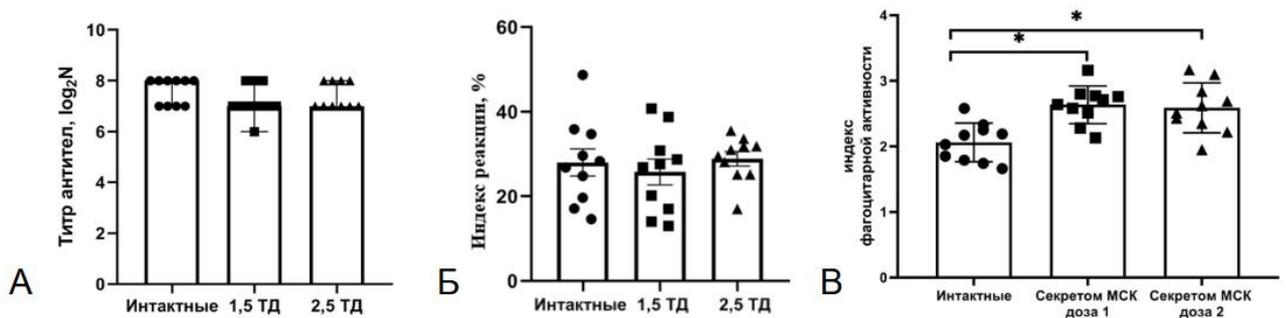


Рис. 22. Изучение влияния препарата на основе секрета МСК на иммунный ответ у мышей. А — Оценка гуморального иммунитета (данные представлены как медиана и квартильный размах). Б — Изучение клеточного иммунитета у мышей после введения препарата (данные представлены как среднее и стандартное отклонение). В — Изучение неспецифического иммунного ответа. Результаты представлены как среднее и стандартное отклонение. Количество животных в каждой группе 10. * $p < 0,05$.

6.3.2. Репродуктивная токсичность при локальном введении под белочную оболочку яичка

Препарат на основе секрета МСК при однократном локальном введении под белочную оболочку яичка не оказал влияния на показатели спермограммы крыс и кроликов. Кроме того в исследованиях репродуктивной токсичности установлено, что введение препарата на основе секрета МСК не влияет на протекание беременности оплодотворённых самок и на пренатальное и постнатальное развитие эмбрионов у потомства экспериментальных животных.

По результатам изучения безопасности препарата на основе секрета МСК при локальном и системном введении грызунам и кроликам в терапевтической дозе и в дозах, превышающих терапевтическую, можно заключить, что изучаемый препарат обладает приемлемым профилем для дальнейших клинических исследований.

Глава 7. Обсуждение

В большинстве случаев мужское бесплодие является идиопатическим, поэтому терапия подбирается эмпирическим путём. Зачастую идиопатическое мужское бесплодие связано с повреждением ниши ССК, в частности, с нарушением паракринной регуляции поддерживающих клеток ниши и стволовых клеток. Важным участником регенерации во многих органах и тканях являются МСК, реализующие своё действие, главным образом, за счёт секреции ряда паракринных факторов — секретома. Более того, в нише ССК есть резидентные МСК, количество которых увеличивается при токсическом повреждении сперматогенеза доксорубицином у мышей. Однако, поскольку не происходит спонтанного восстановления сперматогенеза, по-видимому, при повреждении доксорубицином функциональность резидентных МСК нарушается. В связи с этим, перспективной стратегией для восстановления ниши ССК может быть введение здоровых МСК или комплекса секретируемых ими регуляторных факторов — секретома. В состав секретома МСК входят множество факторов, важных для поддержания сперматогенеза. В частности, глиальный фактор роста (GDNF), фактор роста фибробластов 2 (FGF2), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактор роста пигментного эпителия (PEDF), которые участвуют в поддержании структуры или функции компонентов микроокружения семенников [20, 116, 147]. Более того, косвенные доказательства указывают на некоторое сходство секретома МСК с набором регуляторных молекул, синтезируемых клетками Сертоли [60, 104].

Ранее было показано, что введение секретома МСК крысам под белочную оболочку яичка в модели крипторхизма приводит к восстановлению сперматогенеза [114]. Кроме того, поскольку при локальном введении секретома МСК его компоненты могут быстро разрушаться под действием тканевых протеаз, была предложена готовая лекарственная форма с коллагеном, который может защищать компоненты секретома МСК и являться депо, обеспечивающим постепенное высвобождение регуляторных факторов. Модель крипторхизма является физиологической и частично обратимой, поэтому было важно показать эффективность препарата на секретома МСК на принципиально другой модели с

тяжёлыми нарушениями сперматогенеза, например, токсического повреждения доксорубицином. На данной модели мы показали, что при введении препарата на основе секрета МСК под белочную оболочку яичка мышам на длительном сроке наблюдения через 5 месяцев увеличивается количество сперматозоидов и доля подвижных сперматозоидов. Данный критерий по увеличению количества сперматозоидов был выбран в качестве первичного критерия эффективности в клинических исследованиях лекарственного препарата на основе секрета МСК.

Изучение механизмов регенераторного действия *in vivo* показало тенденцию к восстановлению количества клеточных компонентов ниши ССК внутри семенных канальцев — стволовых клеток и клеток Сертоли. При этом тенденция к увеличению клеток дифферона ССК, положительных по маркеру PCNA, является косвенным показателем восстановления единичных семенных канальцев, что согласуется с результатами гистологического анализа. По-видимому, функционирование лишь единичных семенных канальцев может быть достаточным для появления сперматозоидов.

В интерстициальном пространстве важнейшими поддерживающими клетками являются макрофаги. В нише ССК обнаружены M2 макрофаги, ведущая роль которых состоит в регуляции других поддерживающих клеток и обеспечении иммунопривилегированности ниши [84]. Мы установили, что при повреждении количество CD163+ и CD206+ M2-макрофагов в интерстиции значимо возрастает. Наши данные согласуются с результатами других авторов, которые показали, что количество M2-макрофагов в других моделях повреждения сперматогенеза значительно увеличивается по сравнению с интактными животными [7, 30, 157]. При этом было показано, что при введении препарата на основе секрета МСК число CD163+ и CD206+ макрофагов значимо не меняется как на ранних, так и на поздних сроках повреждения. В то же время макрофаги могут быть не только прямой мишенью секрета МСК, но и промежуточным звеном в реализации эффектов секрета МСК на другие поддерживающие клетки ниши ССК. Например, было показано подавляющее действие макрофагов на секреторную активность и устройство цитоскелета клеток Лейдига в моделях *in vitro* [21, 130].

Так, снижение числа макрофагов после введения секрета МСК может способствовать увеличению секреторной активности клеток Лейдига, что также важно для нормального функционирования ниши ССК.

Для поиска первичной мишени секрета МСК был выполнен анализ биораспределения препарата при введении под белочную оболочку яичка, что является частью исследований фармакокинетики. Стандартные исследования фармакокинетики в случае биологических препаратов неприменимы, что связано с наличием компонентов препарата в организме в детектируемых количествах исходно. Так, для некоторых биологических препаратов с локальным действием Vistaseal (раствор фибриногена и тромбина для остановки кровотечений при операциях), Stratagraft (кератиноциты и фибробласты с коллагеном, механизм действия обусловлен паракринными факторами), одобренных FDA, исследования фармакокинетики не проводили [159, 160]. Для оценки биораспределения препарата на основе секрета МСК в норме и при повреждении мы ввели смесь визуализируемого белкового аналога — рекомбинантного GFP со свиным коллагеном. Было показано, что биораспределение рекомбинантного GFP происходит преимущественно в интерстиции, большую часть которого (около 80%) занимают клетки Лейдига.

In vitro показано, что секретом МСК восстанавливает секрецию тестостерона клетками Лейдига, что стало основой для разработки модели для оценки специфической активности препарата на основе секрета МСК. Предложенный метод биологической стандартизации рекомендуется использовать для оценки специфической фармакологической активности препаратов для восстановления секреторной функции клеток Лейдига.

При этом была показана вовлечённость внутриклеточного сигнального пути ERK/pERK в клетках Лейдига в реализации эффекта секрета МСК. Такой внутриклеточный путь характерен для передачи сигнала многих факторов роста, входящих в состав секрета МСК, например, VEGF, FGF, IGF и др. [19, 46, 129].

Для дальнейшего изучения механизмов действия секрета МСК может быть целесообразным выявление факторов, опосредующих фармакологическое действие

секретома МСК. Важно отметить, что, если существуют значительные корреляции между инструментально измеренными суррогатными показателями и биологической активностью препарата, инструментальные показатели могут использоваться для измерения эффективности [4]. Их можно применять для стандартизации, поскольку использование инструментальных методов по сравнению с клеточными методами даст большую точность и будет менее трудоемким.

Как было показано ранее, некоторые факторы в составе секретома МСК могут участвовать в регуляции компонентов ниши ССК. Ингибиторным анализом *in vivo* на модели токсического повреждения сперматогенеза у мышей мы показали значимый вклад VEGF в составе секретома МСК для восстановления сперматогенеза. Также была показана прямая корреляция между концентрацией VEGF в секретома МСК и количеством тестостерона, секретиремого клетками Лейдига в модели оценки специфической активности. Полученные результаты позволяют рассматривать VEGF в качестве суррогатного маркера фармакологических эффектов секретома МСК. Однако при блокировании VEGF в секретома МСК или его основного рецептора VEGFR2 на клетках Лейдига наблюдается лишь тенденция к снижению уровня секреции тестостерона клетками Лейдига по сравнению с эффектом после добавления полной фракции секретома МСК. Это позволило предположить участие других компонентов секретома МСК в реализации его действия на клетки Лейдига.

На основании данных по регуляции стероидогенеза в ооцитах мы предположили важную роль в регуляции клеток Лейдига некодирующей регуляторной микроРНК-21, которая является высокопредставленной в секретома МС. Считается, что микроРНК — компонент внеклеточных везикул в составе секретома МСК, однако мы показали присутствие микроРНК-21 во вневезикулярной фракции. В модели на клетках Лейдига мы показали, что добавление микроРНК-21 стимулирует секрецию тестостерона клетками Лейдига, при этом ингибирование микроРНК-21 в составе секретома МСК снижает эффект секретома МСК на клетках Лейдига. Это говорит о значимом вкладе микроРНК-21

в составе секрета МСК в стимуляцию клеток Лейдига. Биоинформатическим поиском было установлено возможное действие микроРНК-21 как на индукторов, так и на супрессоров ферментов и регуляторов стероидогенеза в клетках Лейдига.

Разделение секрета МСК на две фракции — внеклеточные везикулы и внеклеточную фракцию (фракцию растворимых факторов) и дальнейшее добавление их к клеткам Лейдига показало, что действие секрета МСК на клетки Лейдига может быть опосредовано преимущественно фракцией растворимых факторов, в частности за счёт содержания VEGF и микроРНК-21. Однако при удалении той или иной фракции или блокировании отдельного компонента, терапевтический эффект секрета МСК на клетках Лейдига не снижался до уровня отрицательного контроля. Это может указывать на наличие других важных для регуляции стероидогенеза в клетках Лейдига компонентов секрета МСК и необходимость использования полной фракции секрета МСК для достижения фармакологических эффектов.

Поскольку неотъемлемой частью доклинических исследований является изучение безопасности лекарственного препарата на двух видах животных, мы провели исследования на грызунах (мышьях и крысах) и негрызунах (кроликах). Было показано, что препарат на основе секрета МСК не оказал токсического влияния на основные системы, органы и ткани, а также на гематологические и биохимические показатели крови и мочи при предполагаемом клиническом пути введения - однократно под белочную оболочку яичка у крыс, а также при двукратном локальном введении у кроликов. В результате изучения местной переносимости было показано повреждение единичных семенных канальцев при введении препарата на основе секрета МСК или плацебо/контрольного вещества, что может быть связано с процедурой введения несжимаемого объёма жидкости. При альтернативном клиническому внутримышечном пути введения у мышьях препарат на основе секрета МСК также показал хорошую переносимость. При изучении специфических видов токсичности не было выявлено клинически значимого токсического влияния на репродуктивную и иммунную системы.

Таким образом, препарат на основе секрета МСК и носитель в составе препарата (коллаген) при введении под белочную оболочку семенника обладают приемлемым профилем безопасности на животных.

Заключение

В диссертационной работе показана эффективность препарата на основе секрета МСК человека в отношении восстановления сперматогенеза на отработанной модели токсического повреждения сперматогенеза доксорубицином. Было изучено действие препарата на основе секрета МСК на основные клеточные мишени ниши ССК при повреждении: ССК и клетки дифферона, клетки Сертоли и макрофаги. В результате исследования биораспределения показана первичная мишень секрета МСК — клетки Лейдига.

На основании этого *in vitro* была разработана модель оценки специфической активности, которая была валидирована и введена в спецификацию для контроля качества препарата на основе секрета МСК. В работе был изучен вклад высокопредставленных компонентов секрета МСК VEGF и GDNF, которые важны для регенерации многих ниш и тканей, в реализацию фармакологического действия секрета МСК в нише ССК. Ингибиторным анализом показан вклад VEGF в составе секрета МСК для восстановления сперматогенеза, в связи с чем VEGF был выбран суррогатным фактором, отражающим биологическую активность секрета МСК. Также показано, что VEGF и микроРНК-21 могут опосредовать эффекты секрета МСК на клетках Лейдига. Изучены возможные внутриклеточные пути и мишени, задействованные в реализации действия секрета МСК и микроРНК-21 в его составе на стероидогенез в клетках Лейдига.

В исследованиях общей токсичности, фармакологической безопасности, а также токсичности в отношении иммунной и репродуктивной системы показана хорошая переносимость препарата на основе секрета МСК.

Полученные данные стали основой для разработки критических показателей качества препарата на основе секрета МСК — специфической активности, подлинности и количественного определения. Результаты, полученные в диссертационной работе, были использованы для формирования пакета документов, поданного в Министерство здравоохранения РФ, на проведение регистрационных клинических исследований препарата на основе секрета МСК для лечения мужского бесплодия, по итогам экспертизы документов было получено разрешение на клинические исследования I/II фазы (№328 от 14 августа 2024 г.), (приложения 3,4).

Выводы

1. На модели токсического повреждения сперматогенеза доксорубицином у мышей показано, что однократное введение препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток человека (МСК) под белочную оболочку яичка способствует восстановлению сперматогенеза, что выражается в увеличении количества сперматозоидов и доли подвижных сперматозоидов, а также частичном восстановлении структуры семенных канальцев.

2. Установлено, что препарат на основе секрета МСК при однократном введении под белочную оболочку яичка реализует своё действие преимущественно интерстициально — в клетках Лейдига. В экспериментах *in vitro* выявлено, что секретом МСК стимулирует секрецию тестостерона клетками Лейдига. Установлено, что действие секрета МСК на клетки Лейдига специфично.

3. Методом ингибиторного анализа установлена вовлечённость фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и микроРНК-21 в реализацию терапевтических эффектов секрета МСК.

4. Разработан метод биологической стандартизации препарата на основе секрета МСК, основанный на способности препарата стимулировать секрецию тестостерона клетками Лейдига.

5. В ходе изучения общетоксического действия установлено, что при однократном введении у крыс 1,5 и 2,5 терапевтической дозы (ТД) под белочную оболочку яичка, трёхкратном внутримышечном введении 1,5 ТД и 2,5 ТД у мышей и двукратном введении у кроликов ТД, 1,5 ТД и 2,5 ТД под белочную оболочку яичка препарат на основе секрета МСК человека не проявляет необратимых токсических свойств в отношении органов и систем животных, а также не влияет на основные гематологические и биохимические показатели крови и мочи.

6. Установлено отсутствие влияния препарата на основе секрета МСК человека при однократном внутримышечном введении в дозах 1,5 ТД и 2,5 ТД на гуморальный и клеточный иммунный ответ, выявлено увеличение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов. Препарат на основе секрета МСК

человека в дозах 1,5 ТД и 2,5 ТД при локальном введении под белочную оболочку не обладает репродуктивной (генеративной) токсичностью.

Практические рекомендации

1. Рекомендуется использовать предложенные подходы к стандартизации препарата на основе секрета МСК для других многокомпонентных биологических препаратов.
2. Предложенный метод биологической стандартизации рекомендуется использовать для оценки специфической фармакологической активности препаратов для восстановления секреторной функции клеток Лейдига.
3. Предложенную модель нарушения сперматогенеза доксорубицином рекомендуется использовать для исследования препаратов, восстанавливающих репродуктивную функцию у мужчин.

Список цитируемой литературы

1. Гущин Я. А., Мужикян А.А. Влияние фиксирующих жидкостей на микроскопическую структуру органов мелких лабораторных животных // Международный вестник ветеринарии. – 2014. – (2) – С. 99–95.
2. Евразийская экономическая комиссия Фармакопея Евразийского Экономического Союза // 2020.
3. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А. Н. Миронов. – 2012. – 944 с.
4. Решение Совета ЕЭК № 89 Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза // 2016.
5. Сагарадзе Г. Участие секрета мезенхимных стромальных клеток в восстановлении сперматогенеза. – 2019.
6. Abdollahifar MA. Impaired spermatogenesis caused by busulfan is partially ameliorated by treatment with conditioned medium of adipose tissue derived mesenchymal stem cells // Azad N, Faraji Sani M, Raoofi A, Abdi S, Aliaghaei A, et al. // Biotechnic & Histochemistry. – 2022. – Vol. 97(2) – P. 107–117.
7. Achua JK. Histopathology and Ultrastructural Findings of Fatal COVID-19 Infections on Testis. // Chu KY, Ibrahim E, Khodamoradi K, Delma KS, Iakymenko OA, et al. // The world journal of men's health. – 2021. – Vol. 39(1) – P. 65–74.
8. Agarwal A. Male infertility // Baskaran S, Parekh N, Cho CL, Henkel R, Vij S, et al. // The Lancet. – 2021. – Vol. 397(10271) – P. 319–333.
9. Akinjo O. O., Gant T. W., Marczyklo E. L. Perturbation of microRNA signalling by doxorubicin in spermatogonial, Leydig and Sertoli cell lines: In vitro // Toxicology Research. – 2018. – Vol. 7(5) – P. 760–770.
10. Allen CM. Comparative gonadotoxicity of the chemotherapy drugs cisplatin and carboplatin on prepubertal mouse gonads. // Lopes F, Mitchell RT, Spears N. // Molecular human reproduction. – 2020. – Vol. 26(3) – P. 129–140.
11. Amory JK. Melphalan, alone or conjugated to an FSH- β peptide, kills murine testicular cells in vitro and transiently suppresses murine spermatogenesis in vivo. // Hong S, Yu X, Muller CH, Faustman E, Goldstein A. // Theriogenology. – 2014. – Vol. 82(1) – P. 152–159.
12. Anand S. Underlying Mechanisms that Restore Spermatogenesis on Transplanting Healthy Niche Cells in Busulphan Treated Mouse Testis. // Bhartiya D, Sriraman K, Mallick A. // Stem cell reviews and reports. – 2016. – Vol. 12(6) – P. 682–697.

13. Andric S. A., Kostic T. S. Regulation of Leydig cell steroidogenesis: intriguing network of signaling pathways and mitochondrial signalosome // *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*. – 2019. – (6) – P. 7–20.
14. Bari E. Mesenchymal stem/stromal cell secretome for lung regeneration: The long way through «pharmaceuticalization» for the best formulation. // Ferrarotti I, Torre ML, Corsico AG, Perteghella S. // *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. – 2019. – (309) – P. 11–24.
15. Barnett L. B., Lewis S. E. Chlornaphazine and chlorambucil induce dominant lethal mutations in male mice. // *Mutation research*. – 2003. – Vol. 543(2) – P. 145–154.
16. Basalova N. // Secretome of Mesenchymal Stromal Cells Prevents Myofibroblasts Differentiation by Transferring Fibrosis-Associated microRNAs within Extracellular Vesicles. // Sagaradze G, Arbatskiy M, Evtushenko E, Kulebyakin K, Grigorieva O. // *Cells*. – 2020. – Vol. 9(5) – P. 1272.
17. Beaud H., Pelt A. van, Delbes G. Doxorubicin and vincristine affect undifferentiated rat spermatogonia. // *Reproduction*. – 2017. – Vol. 153(6) – P. 725–735.
18. Behre H. M. Clinical use of FSH in male infertility // *Frontiers in Endocrinology*. – 2019. – (MAY 10) – P. 1–8.
19. Bhalla S. Protective role of IGF-1 and GLP-1 signaling activation in neurological dysfunctions // Mehan S, Khan A, Rehman MU. // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 2022. – (142) – P. 104896.
20. Bhang DH. Testicular endothelial cells are a critical population in the germline stem cell niche. // Kim BJ, Kim BG, Schadler K, Baek KH, Kim YH, et al. // *Nature communications*. – 2018. – Vol. 9(1) – P. 4379.
21. Bhushan S. Immune Cell Subtypes and Their Function in the Testis // Theas MS, Guazzone VA, Jacobo P, Wang M, Fijak M, et al. // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – (11) – P. 583304.
22. Bisht S. Oxidative stress and male infertility // Faiq M, Tolahunase M, Dada R. // *Nature Reviews Urology*. – 2017. – Vol. 14(8) – P. 470–485.
23. Bloise E. ATP-binding cassette transporters in reproduction: a new frontier // Ortiga-Carvalho TM, Reis FM, Lye SJ, Gibb W, Matthews SG. // *Human Reproduction Update*. – 2015. – P. dmv049.
24. Bujan L. Impact of lymphoma treatments on spermatogenesis and sperm deoxyribonucleic acid: a multicenter prospective study from the CECOS network. // Walschaerts M, Brugnion F, Daudin M, Berthaut I, Auger J. et al. // *Fertility and sterility*. – 2014. – Vol. 102(3) – P. 667-674.e3.

25. Cai Y. Mesenchymal stem cell-secreted factors delayed spermatogenesis injuries induced by busulfan involving intercellular adhesion molecule regulation // Xiong C, Shen S, Rao J, Liu T, Qiu F. // *Andrologia*. – 2019. – Vol. 51(6) – P. e13285.
26. Catizone A. Hepatocyte Growth Factor (HGF) Modulates Leydig Cell Extracellular Matrix Components // Ricci G, Tufano MA, Perfetto B, Canipari R, Galdieri M. // *Journal of Andrology*. – 2010. – Vol. 31(3) – P. 306–313.
27. Chatterjee R. Germ cell failure and Leydig cell insufficiency in post-pubertal males after autologous bone marrow transplantation with BEAM for lymphoma. // Mills W, Katz M, McGarrigle HH, Goldstone AH. // *Bone marrow transplantation*. – 1994. – Vol. 13(5) – P. 519–522.
28. Chen G. Medical management of male infertility: now and future. // Kathrins M, Ohlander S, Niederberger C. // *Current opinion in urology*. – 2023. – Vol. 33(1) – P. 10–15.
29. Chen LY. Frontier Review of the Molecular Mechanisms and Current Approaches of Stem Cell-Derived Exosomes // Kao TW, Chen CC, Niaz N, Lee HL, Chen YH, et al. // *Cells*. – 2023. – Vol. 12(7) – P. 1018.
30. Chen Q., Deng T., Han D. Testicular immunoregulation and spermatogenesis. // *Seminars in cell & developmental biology*. – 2016. – (59) – P. 157–165.
31. Choi YS. The Role of Foxo3 in Leydig Cells // Song JE, Kong BS, Hong JW, Novelli S, Lee EJ. // *Yonsei Medical Journal*. – 2015. – Vol. 56(6) – P. 1590.
32. Ciccocioppo R. Regenerative medicine: the red planet for clinicians. // Cantore A, Chaimov D, Orlando G. // *Internal and emergency medicine*. – 2019. – Vol. 14(6) – P. 911–921.
33. Colón E. Insulin-Like Growth Factor-I Is an Important Antiapoptotic Factor for Rat Leydig Cells during Postnatal Development // Zaman F, Axelson M, Larsson O, Carlsson-Skwirut C, Svechnikov KV, et al. // *Endocrinology*. – 2007. – Vol. 148(1) – P. 128–139.
34. Couch Y. A brief history of nearly EV-erything - The rise and rise of extracellular vesicles. // Buzàs EI, Di Vizio D, Gho YS, Harrison P, Hill AF, et al. // *Journal of extracellular vesicles*. – 2021. – Vol. 10(14) – P. e12144.
35. Crisóstomo L. Molecular mechanisms and signaling pathways involved in the nutritional support of spermatogenesis by sertoli cells // Alves MG, Gorga A, Sousa M, Riera MF, Galardo MN. et al. // *Methods in Molecular Biology*. – 2018. – (1748) – P. 129–155.
36. Cross M. J. VEGF-receptor signal transduction. // Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. // *Trends in biochemical sciences*. – 2003. – Vol. 28(9) – P. 488–494.
37. Curley M. Leukemia inhibitory factor-receptor signalling negatively regulates gonadotrophin-stimulated testosterone production in mouse Leydig Cells // Darbey A, O'Donnell L, Kilcoyne

- KR, Wilson K, Mungall W, et al. // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2022. – (544) – P. 111556.
38. De Rooij D. G. The nature and dynamics of spermatogonial stem cells // *Development (Cambridge)*. – 2017. – Vol. 144(17) – P. 3022–3030.
39. Del Bravo J. Hepatocyte Growth Factor-Modulated Rat Leydig Cell Functions // Catizone A, Ricci G, Galdieri M. // *Journal of Andrology*. – 2007. – Vol. 28(6) – P. 866–874.
40. Delic J. I., Stanley J. A., Harwood J. R. Testicular function in adult rats treated with the alkylating agent chlorambucil. // *Archives of andrology*. – 1986. – Vol. 17(1) – P. 87–98.
41. Diao L. Roles of Spermatogonial Stem Cells in Spermatogenesis and Fertility Restoration // Turek PJ, John CM, Fang F, Reijo Pera RA. // *Frontiers in Endocrinology*. – 2022. – (13) – P. 895528.
42. Doyle L. M., Wang M. Z. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. // *Cells*. – 2019. – Vol. 8(7).
43. Eisenberg ML. Male infertility // Esteves SC, Lamb DJ, Hotaling JM, Giwercman A, Hwang K, et al. // *Nature Reviews Disease Primers*. – 2023. – Vol. 9(1) – P. 49.
44. Elsharkasy OM. Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how? // Nordin JZ, Hagey DW, de Jong OG, Schiffelers RM, Andaloussi SE, et al. // *Advanced drug delivery reviews*. – 2020. – (159) – P. 332–343.
45. EMA ICH S8. Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals // 2006.
46. Estrada C. C., Maldonado A., Mallipattu S. K. Therapeutic Inhibition of VEGF Signaling and Associated Nephrotoxicities // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2019. – Vol. 30(2) – P. 187–200.
47. Fei X. Molecular characterization and expression profile of the ALDH1A1 gene and its functions in yak luteal cells // Zhu Y, Pan B, Cheng Y, Yang Q, Xie Y, et al. // *Theriogenology*. – 2024. – (223) – P. 98–107.
48. Figueira M. I. Hormonal regulation of c-KIT receptor and its ligand: implications for human infertility? // Cardoso HJ, Correia S, Maia CJ, Socorro S. // *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. – 2014. – Vol. 49(1–3) – P. 1–19.
49. Forbes C. M., Flannigan R., Schlegel P. N. Spermatogonial stem cell transplantation and male infertility: Current status and future directions // *Arab Journal of Urology*. – 2018. – Vol. 16(1) – P. 171–180.
50. Fortin J. Conservation of mechanisms mediating gonadotrophin-releasing hormone 1 stimulation of human luteinizing hormone β subunit transcription // Lamba P, Wang Y, Bernard DJ. // *MHR: Basic science of reproductive medicine*. – 2009. – Vol. 15(2) – P. 77–87.

51. Fu Y. Emerging understanding of apoptosis in mediating mesenchymal stem cell therapy // Sui B, Xiang L, Yan X, Wu D, Shi S. // *Cell Death & Disease*. – 2021. – Vol. 12(6) – P. 596.
52. Galipeau J. Macrophages at the nexus of mesenchymal stromal cell potency: The emerging role of chemokine cooperativity. // *Stem cells (Dayton, Ohio)*. – 2021. – Vol. 39(9) – P. 1145–1154.
53. Galitsyna EV. Cell-based medicinal products: a review of current research // Kulikova EA, Pavelyev YuA, Kuznetsova OS, Senina AS, Gusev AB. // *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. – 2024. – Vol. 24(4) – P. 428–442.
54. Gassei K., Orwig K. E. Experimental methods to preserve male fertility and treat male factor infertility // *Fertility and Sterility*. – 2016. – Vol. 105(2) – P. 256–266.
55. Generoso WM. Dominant lethal and heritable translocation tests with chlorambucil and melphalan in male mice. // Witt KL, Cain KT, Hughes L, Cacheiro NL, Lockhart AM, et al. // *Mutation research*. – 1995. – Vol. 345(3–4) – P. 167–180.
56. Gharagozloo P. A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models. // Gutiérrez-Adán A, Champroux A, Noblanc A, Kocer A, Calle A, et al. // *Human reproduction (Oxford, England)*. – 2016. – Vol. 31(2) – P. 252–262.
57. Ghasemi M. Mesenchymal stromal cell-derived secretome-based therapy for neurodegenerative diseases: overview of clinical trials. // Roshandel E, Mohammadian M, Farhadhosseinabadi B, Akbarzadehlaleh P, Shamsasenjan K. // *Stem cell research & therapy*. – 2023. – Vol. 14(1) – P. 122.
58. Ghobadi E. The mechanisms of cyclophosphamide-induced testicular toxicity and the protective agents. // Moloudizargari M, Asghari MH, Abdollahi M. // *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. – 2017. – Vol. 13(5) – P. 525–536.
59. Gómez-López S., Lerner R. G., Petritsch C. Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2014. – Vol. 71(4) – P. 575–597.
60. Gong D. Are Sertoli cells a kind of mesenchymal stem cells? // Zhang C, Li T, Zhang J, Zhang N, Tao Z, et al. // *American Journal of Translational Research*. – 2017. – Vol. 9(3) – P. 1067–1074.
61. He X. MSC-Derived Exosome Promotes M2 Polarization and Enhances Cutaneous Wound Healing. // Dong Z, Cao Y, Wang H, Liu S, Liao L, et al. // *Stem cells international*. – 2019. – (2019) – P. 7132708.
62. Hejretová L. Comparison of the immunomodulatory effect of single MSC batches versus pooled MSC products // Čedíková M, Dolejšová M, Vlas T, Jindra P, Lysák D, et al. // *Cell and Tissue Banking*. – 2020. – Vol. 21(1) – P. 119–129.

63. Hofmann M.-C., McBeath E. Sertoli Cell-Germ Cell Interactions Within the Niche: Paracrine and Juxtacrine Molecular Communications // *Frontiers in Endocrinology*. – 2022. – (13) – P. 897062.
64. Hoggatt J., Kfoury Y., Scadden D. T. Hematopoietic Stem Cell Niche in Health and Disease // *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. – 2016. – (11) – P. 555–581.
65. Hosseini A. Cyclophosphamide-induced testicular toxicity ameliorate by American ginseng treatment: An experimental study. // Zare S, Borzouei Z, Ghaderi Pakdel F. // *International journal of reproductive biomedicine*. – 2018. – Vol. 16(11) – P. 711–718.
66. Huang Y., Wu Q., Tam P. K. H. Immunomodulatory Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells and Their Potential Clinical Applications. // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – Vol. 23(17).
67. Hussein YM. Anti-oxidative and anti-apoptotic roles of spermatogonial stem cells in reversing cisplatin-induced testicular toxicity. // Mohamed RH, Shalaby SM, Abd El-Haleem MR, Abd El Motteleb DM. // *Cytotherapy*. – 2015. – Vol. 17(11) – P. 1646–1654.
68. Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. // *Psychopharmacologia*. – 1968. – Vol. 13(3) – P. 222–257.
69. Kalinina N. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. // Kharlampieva D, Loguinova M, Butenko I, Pobeguts O, Efimenko A, et al. // *Stem cell research & therapy*. – 2015. – (6) – P. 221.
70. Kharazi U., Badalzadeh R. A review on the stem cell therapy and an introduction to exosomes as a new tool in reproductive medicine // *Reproductive Biology*. – 2020. – Vol. 20(4) – P. 447–459.
71. Knight M. N., Hankenson K. D. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration // *Advances in Wound Care*. – 2013. – Vol. 2(6) – P. 306–316.
72. Kulebyakina M. Balance between Pro- and Antifibrotic Proteins in Mesenchymal Stromal Cell Secretome Fractions Revealed by Proteome and Cell Subpopulation Analysis // Basalova N, Butuzova D, Arbatsky M, Chechekhin V, Kalinina N, et al. // *International journal of molecular sciences*. – 2023. – Vol. 25(1) – P. 290.
73. Kumar A., Raut S., Balasinor N. H. Endocrine regulation of sperm release // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2018. – Vol. 30(12) – P. 1595.
74. Kurowska P. Spexin role in human granulosa cells physiology and PCOS: expression and negative impact on steroidogenesis and proliferation // Dawid M, Oprocha J, Respekta N, Serra L, Estienne A, et al. // *Biology of Reproduction*. – 2023. – Vol. 109(5) – P. 705–719.

75. Kusynová Z. Unmet Medical Need as a Driver for Pharmaceutical Sciences – A Survey Among Scientists // Pauletti GM, Van Den Ham HA, Leufkens HGM, Mantel-Teeuwisse AK. // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2022. – Vol. 111(5) – P. 1318–1324.
76. Lan HC. Cyclic AMP Stimulates SF-1-Dependent CYP11A1 Expression through Homeodomain-Interacting Protein Kinase 3-Mediated Jun N-Terminal Kinase and c-Jun Phosphorylation // Li HJ, Lin G, Lai PY, Chung B chu. // *Molecular and Cellular Biology*. – 2007. – Vol. 27(6) – P. 2027–2036.
77. Lee P. A., Houk C. P. Cryptorchidism // *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*. – 2013. – Vol. 20(3) – P. 210–216.
78. Lemmon M. A., Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases // *Cell*. – 2010. – Vol. 141(7) – P. 1117–1134.
79. Lin YM. Fibroblast growth factor 9 stimulates steroidogenesis in postnatal Leydig cells // Tsai CC, Chung CL, Chen PR, Sunny Sun H, Tsai SJ, et al. // *International Journal of Andrology*. – 2010. – Vol. 33(3) – P. 545–553.
80. Lu D. Mesenchymal Stem Cell-Macrophage Crosstalk and Maintenance of Inflammatory Microenvironment Homeostasis. // Xu Y, Liu Q, Zhang Q. // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2021. – (9) – P. 681171.
81. Marchetti F. Etoposide induces heritable chromosomal aberrations and aneuploidy during male meiosis in the mouse. // Pearson FS, Bishop JB, Wyrobek AJ. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – Vol. 98(7) – P. 3952–3957.
82. Marchetti F. Etoposide induces chromosomal abnormalities in mouse spermatocytes and stem cell spermatogonia. // Pearson FS, Bishop JB, Wyrobek AJ. // *Human reproduction (Oxford, England)*. – 2006. – Vol. 21(4) – P. 888–895.
83. Meistrich ML. Rapid recovery of spermatogenesis after mitoxantrone, vincristine, vinblastine, and prednisone chemotherapy for Hodgkin's disease. // Wilson G, Mathur K, Fuller LM, Rodriguez MA, McLaughlin P. // *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 1997. – Vol. 15(12) – P. 3488–3495.
84. Mossadegh-Keller N., Sieweke M. H. Testicular macrophages: Guardians of fertility. // *Cellular immunology*. – 2018. – (330) – P. 120–125.
85. Motoike S. Clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes generated with xeno-free conditions facilitate bone regeneration via direct and indirect osteogenesis // Kajiya M, Komatsu N, Horikoshi S, Ogawa T, Sone H. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20(16).
86. Moudi M. Vinca alkaloids. // Go R, Yien CYS, Nazre M. // *International journal of preventive medicine*. – 2013. – Vol. 4(11) – P. 1231–1235.

87. Mruk D. D., Cheng C. Y. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation // *Endocrine Reviews*. – 2015. – Vol. 36(5) – P. 564–591.
88. Murry C. E., Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. // *Cell*. – 2008. – Vol. 132(4) – P. 661–680.
89. Múzes G., Sipos F. Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A Potential Therapeutic Option for Autoimmune and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. // *Cells*. – 2022. – Vol. 11(15).
90. Namoju RC. Pre-pubertal exposure of cytarabine-induced testicular atrophy, impaired spermatogenesis and germ cell DNA damage in SD rats. // Khan S, Patel RS, Shera FY, Trivedi PP, Kushwaha S. et al. // *Toxicology mechanisms and methods*. – 2014. – Vol. 24(9) – P. 703–712.
91. Neto FTL. Spermatogenesis in humans and its affecting factors // Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2016. – (59) – P. 10–26.
92. Nikolic A. Primordial Germ Cells: Current Knowledge and Perspectives. // Volarevic V, Armstrong L, Lako M, Stojkovic M. // *Stem cells international*. – 2016. – (2016) – P. 1741072.
93. O'Donnell L., Smith L. B., Rebourcet D. Sertoli cells as key drivers of testis function // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2022. – (121) – P. 2–9.
94. Ofiteru AM. Qualifying Osteogenic Potency Assay Metrics for Human Multipotent Stromal Cells: TGF- β 2 a Telling Eligible Biomarker // Becheru DF, Gharbia S, Balta C, Herman H, Mladin B. // *Cells*. – 2020. – Vol. 9(12) – P. 2559.
95. Olivares O. Collagen-derived proline promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell survival under nutrient limited conditions. // Mayers JR, Gouirand V, Torrence ME, Gicquel T, Borge L, et al. // *Nature communications*. – 2017. – (8) – P. 16031.
96. Paiva L. Identification of peripheral oxytocin-expressing cells using systemically applied cell-type specific adeno-associated viral vector. // Lozic M, Allchorne A, Grinevich V, Ludwig M. // *Journal of Neuroendocrinology* – 2021. – Vol. 33(5) – P. e12970.
97. Pajarinen J. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. // Lin T, Gibon E, Kohno Y, Maruyama M, Nathan K, et al. // *Biomaterials*. – 2019. – (196) – P. 80–89.
98. Palozi RAC. Pharmacological safety of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel in rabbits. // Guarnier LP, Romão PVM, Nocchi SR, Dos Santos CC, Lourenço ELB, et al. // *Toxicology reports*. – 2019. – (6) – P. 616–624.
99. Pang SHM. Mesenchymal stromal cell apoptosis is required for their therapeutic function // D'Rozario J, Mendonca S, Bhuvan T, Payne NL, Zheng D, et al. // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12(1) – P. 6495.
100. Parekh P. A., Garcia T. X., Hofmann M.-C. Regulation of GDNF expression in Sertoli cells. // *Reproduction (Cambridge, England)*. – 2019. – Vol. 157(3) – P. R95–R107.

101. Perrard MH. Complete Human and Rat Ex Vivo Spermatogenesis from Fresh or Frozen Testicular Tissue // Sereni N, Schluth-Bolard C, Blondet A, d'Estaing SG, Plotton I, et al. // *Biology of Reproduction*. – 2016. – Vol. 95(4) – P. 89–89.
102. Pisarska MD. LATS1 phosphorylates forkhead L2 and regulates its transcriptional activity // Kuo FT, Bentsi-Barnes IK, Khan S, Barlow GM. // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. – 2010. – Vol. 299(1) – P. E101–E109.
103. Poderoso C. The spatial and temporal regulation of the hormonal signal. Role of mitochondria in the formation of a protein complex required for the activation of cholesterol transport and steroids synthesis // Duarte A, Cooke M, Orlando U, Gottifredi V, Solano AR. // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2013. – Vol. 371(1–2) – P. 26–33.
104. Porubska B. Sertoli Cells Possess Immunomodulatory Properties and the Ability of Mitochondrial Transfer Similar to Mesenchymal Stromal Cells. // Vasek D, Somova V, Hajkova M, Hlaviznova M, Tlapakova T. // *Stem cell reviews and reports*. – 2021. – Vol. 17(5) – P. 1905–1916.
105. Potter S. J., DeFalco T. Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. // *Reproduction (Cambridge, England)*. – 2017. – Vol. 153(4) – P. R151–R162.
106. Pourmoghadam Z. Current approaches for the treatment of male infertility with stem cell therapy // Aghebati-Maleki L, Motalebnezhad M, Yousefi B, Yousefi M. // *Journal of Cellular Physiology*. – 2018. – Vol. 233(10) – P. 6455–6469.
107. Punab M. Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts // Poolamets O, Paju P, Vihljajev V, Pomm K, Ladva R. // *Human Reproduction*. – 2016. – P. humrep;dew284v1.
108. Radford J. A. Is prevention of sterility possible in men? // *Annals of Oncology*. – 2000. – Vol. 11(SUPPL. 3) – P. 173–174.
109. Regueira M. Novel molecular mechanisms involved in hormonal regulation of lactate production in Sertoli cells // Artagaveytia SL, Galardo MN, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Meroni SB, et al. // *REPRODUCTION*. – 2015. – Vol. 150(4) – P. 311–321.
110. Ren F. Platelet-derived growth factor-BB and epidermal growth factor promote dairy goat spermatogonial stem cells proliferation via Ras/ERK1/2 signaling pathway // Fang Q, Xi H, Feng T, Wang L, Hu J. // *Theriogenology*. – 2020. – (155) – P. 205–212.
111. Renu K., Valsala Gopalakrishnan A. Deciphering the molecular mechanism during doxorubicin-mediated oxidative stress, apoptosis through Nrf2 and PGC-1 α in a rat testicular milieu // *Reproductive Biology*. – 2019. – Vol. 19(1) – P. 22–37.
112. Rooij D. G. de The spermatogonial stem cell niche in mammals / D. G. de Rooij. – Elsevier Inc., 2015. – 99–121 c.

113. Ryan B., Joilin G., Williams J. M. Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2015. – (8).
114. Sagaradze G. A magic kick for regeneration: Role of mesenchymal stromal cell secretome in spermatogonial stem cell niche recovery // Basalova N, Kirpatovsky V, Ohobotov D, Nimiritsky P, Grigorieva O, et al. // *Stem Cell Research and Therapy*. – 2019. – Vol. 10(1) – P. 1–10.
115. Sagaradze G. Regenerative medicine for male infertility: a focus on stem cell niche injury models. // Monakova A, Basalova N, Popov V, Balabanyan V, Efimenko A. // *Biomedical journal*. – 2022.
116. Sagaradze GD. Application of rat cryptorchidism model for the evaluation of mesenchymal stromal cell secretome regenerative potential // Basalova NA, Kirpatovsky VI, Ohobotov DA, Grigorieva OA, Balabanyan VY, et al. // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2019. – Vol. 109 – P. 1428–1436.
117. Sagaradze GD. Mesenchymal Stromal Cells as Critical Contributors to Tissue Regeneration. // Basalova NA, Efimenko AY, Tkachuk VA. // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2020. – (8) – P. 576176.
118. Sakumoto R. Expression of mRNAs for interleukin-4, interleukin-6 and their receptors in porcine corpus luteum during the estrous cycle // Komatsu T, Kasuya E, Saito T, Okuda K. // *Domestic Animal Endocrinology*. – 2006. – Vol. 31(3) – P. 246–257.
119. Samir M. Follicular expression of pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor- α (TNF α), interleukin 6 (IL6) and their receptors in cattle: TNF α , IL6 and macrophages suppress thecal androgen production in vitro // Glister C, Mattar D, Laird M, Knight PG. // *Reproduction*. – 2017. – Vol. 154(1) – P. 35–49.
120. Samsonraj RM. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine // Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, Van Wijnen AJ, Cool SM. // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2017. – Vol. 6(12) – P. 2173–2185.
121. Samuelsson H. Optimizing in vitro conditions for immunomodulation and expansion of mesenchymal stromal cells // Ringdén O, Lönnies H, Blanc KL. // *Cytherapy*. – 2009. – Vol. 11(2) – P. 129–136.
122. Sawaied A. The Presence of Colony-Stimulating Factor-1 and Its Receptor in Different Cells of the Testis; It Involved in the Development of Spermatogenesis In Vitro // Arazi E, AbuElhija A, Lunenfeld E, Huleihel M. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22(5) – P. 2325.

123. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. // *Blood cells*. – 1978. – Vol. 4(1–2) – P. 7–25.
124. Shabani R. In vitro toxicity assay of cisplatin on mouse acute lymphoblastic leukaemia and spermatogonial stem cells. // Ashtari K, Behnam B, Izadyar F, Asgari H, Asghari Jafarabadi M, et al. // *Andrologia*. – 2016. – Vol. 48(5) – P. 584–594.
125. Shang T. Toll-Like Receptor-Initiated Testicular Innate Immune Responses in Mouse Leydig Cells // Zhang X, Wang T, Sun B, Deng T, Han D. // *Endocrinology*. – 2011. – Vol. 152(7) – P. 2827–2836.
126. Smith EP. Insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) concentration in rat Sertoli cell-conditioned medium is regulated by a pathway involving association of IGFBP-3 with cell surface proteoglycans. // Lu L, Chernausk SD, Klein DJ. // *Endocrinology*. – 1994. – Vol. 135(1) – P. 359–364.
127. Smith JF. Testicular niche required for human spermatogonial stem cell expansion. // Yango P, Altman E, Choudhry S, Poelzl A, Zamah AM. // *Stem cells translational medicine*. – 2014. – Vol. 3(9) – P. 1043–1054.
128. Song J. Novel mutations of TEX11 are associated with non-obstructive azoospermia // Sha Y, Liu X, Zeng X, Zhao X. // *Frontiers in Endocrinology*. – 2023. – (14) – P. 1159723.
129. Soszyńska A., Klimczewska K., Suwińska A. FGF/ERK signaling pathway: how it operates in mammalian preimplantation embryos and embryo-derived stem cells // *The International Journal of Developmental Biology*. – 2019. – Vol. 63(3–4–5) – P. 171–186.
130. Sun X. R., Hedger M. P., Risbridger G. P. The effect of testicular macrophages and interleukin-1 on testosterone production by purified adult rat Leydig cells cultured under in vitro maintenance conditions. // *Endocrinology*. – 1993. – Vol. 132(1) – P. 186–192.
131. Takahashi H. Evaluation of testicular toxicology of doxorubicin based on microarray analysis of testicular specific gene expression. // Tainaka H, Umezawa M, Takeda K, Tanaka H, Nishimune Y, et al. // *The Journal of toxicological sciences*. – 2011. – Vol. 36(5) – P. 559–567.
132. Tanigaki R. C-kit expression in spermatogonia damaged by doxorubicin exposure in mice // Sueoka K, Tajima H, Nakabayashi A, Sato K, Asada H, et al. // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. – 2013. – Vol. 39(3) – P. 692–700.
133. Théry C. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. // Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. // *Journal of extracellular vesicles*. – 2018. – Vol. 7(1) – P. 1535750.

134. Tian R. Fibroblast growth factor-5 promotes spermatogonial stem cell proliferation via ERK and AKT activation // Yao C, Yang C, Zhu Z, Li C, Zhi E. et al. // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2019. – Vol. 10(1) – P. 40.
135. Tremblay A. R., Delbes G. In vitro study of doxorubicin-induced oxidative stress in spermatogonia and immature Sertoli cells // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2018. – (348) – P. 32–42.
136. Tian R. Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: implications for regenerative therapy // Yao C, Yang C, Zhu Z, Li C, Zhi E, et al. // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2017. – Vol. 8(1) – P. 45.
137. Velez D., Hwang K. Personalized Medicine for the Infertile Male // *Urologic Clinics of North America*. – 2020. – Vol. 47(4) – P. 523–536.
138. Verhoeven G., Cailleau J. Stimulatory effects of epidermal growth factor on steroidogenesis in Leydig cells // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 1986. – Vol. 47(1–2) – P. 99–106.
139. Virtanen H. E., Adamsson A. Cryptorchidism and endocrine disrupting chemicals // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2012. – Vol. 355(2) – P. 208–220.
140. Viswanathan S. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. // Shi Y, Galipeau J, Krampera M, Leblanc K, Martin I, et al. // *Cytotherapy*. – 2019. – Vol. 21(10) – P. 1019–1024.
141. Voloshin N. Practical Use of Immortalized Cells in Medicine: Current Advances and Future Perspectives // Tyurin-Kuzmin P, Karagyaour M, Akopyan Z, Kulebyakin K. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24(16) – P. 12716.
142. Weger B. D., Gachon F. The Insulin/Insulin-like Growth Factor signalling connects metabolism with sexual differentiation // *Acta Physiologica*. – 2021. – Vol. 231(3) – P. e13576.
143. Wernig M. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. // Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105(15) – P. 5856–5861.
144. Wiest E. F., Zubair A. C. Challenges of manufacturing mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles in regenerative medicine. // *Cytotherapy*. – 2020. – Vol. 22(11) – P. 606–612.
145. Williams D., Crofton P. M., Levitt G. Does ifosfamide affect gonadal function? // *Pediatric blood & cancer*. – 2008. – Vol. 50(2) – P. 347–351.

146. Willis GR. Mesenchymal Stromal Cell Exosomes Ameliorate Experimental Bronchopulmonary Dysplasia and Restore Lung Function through Macrophage Immunomodulation. // Fernandez-Gonzalez A, Anastas J, Vitali SH, Liu X, Ericsson M. et al. // American journal of respiratory and critical care medicine. – 2018. – Vol. 197(1) – P. 104–116.
147. Windschüttl S. Human testicular peritubular cells secrete pigment epithelium-derived factor (PEDF), which may be responsible for the avascularity of the seminiferous tubules. // Kampfer C, Mayer C, Flenkenthaler F, Fröhlich T, Schwarzer JU, et al. // Scientific reports. – 2015. – (5) – P. 12820.
148. Xie Y. FGF/FGFR signaling in health and disease. // Su N, Yang J, Tan Q, Huang S, Jin M, et al. // Signal transduction and targeted therapy. – 2020. – Vol. 5(1) – P. 181.
149. Yamamoto K. Oxytocin enhances progesterone production with upregulation of BMP-15 activity by granulosa cells // Nakano Y, Iwata N, Soejima Y, Suyama A, Hasegawa T, et al. // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2023. – (646) – P. 103–109.
150. Yamamoto K. Stimulatory effects of vasopressin on progesterone production and BMP signaling by ovarian granulosa cells // Nakano Y, Iwata N, Soejima Y, Suyama A, Hasegawa T, et al. // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2023. – (667) – P. 132–137.
151. Yoon M. J., Roser J. F. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) protects cultured equine Leydig cells from undergoing apoptosis. // Animal reproduction science. – 2010. – Vol. 122(3–4) – P. 353–358.
152. Yoshihara M., Hayashizaki Y., Murakawa Y. Genomic Instability of iPSCs: Challenges Towards Their Clinical Applications. // Stem cell reviews and reports. – 2017. – Vol. 13(1) – P. 7–16.
153. Yu XC. A new TEX11 mutation causes azoospermia and testicular meiotic arrest // Li MJ, Cai FF, Yang SJ, Liu HB, Zhang HB. // Asian Journal of Andrology. – 2021. – Vol. 23(5) – P. 510–515.
154. Zachow R., Uzumcu M. The hepatocyte growth factor system as a regulator of female and male gonadal function // Journal of Endocrinology. – 2007. – Vol. 195(3) – P. 359–371.
155. Zhang C. Eradication of specific donor-dependent variations of mesenchymal stem cells in immunomodulation to enhance therapeutic values // Zhou L, Wang Z, Gao W, Chen W, Zhang H, et al. // Cell Death & Disease. – 2021. – Vol. 12(4) – P. 357.
156. Zhang Y. Ferredoxin reductase and p53 are necessary for lipid homeostasis and tumor suppression through the ABCA1–SREBP pathway // Mohibi S, Vasilatis DM, Chen M, Zhang J, Chen X. // Oncogene. – 2022. – Vol. 41(12) – P. 1718–1726.
157. Zheng W. Evaluation of immune status in testis and macrophage polarization associated with testicular damage in patients with nonobstructive azoospermia. // Zhang S, Jiang S, Huang

- Z, Chen X, Guo H, et al. // American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989). – 2021. – Vol. 86(5) – P. e13481.
158. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях // 2012.
159. BLA Clinical Review Memorandum [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/stratagraft>.
160. Clinical Review [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/approved-blood-products/vistaseal>.

Приложения

Приложение 1. Результаты исследования общей токсичности препарата на основе секрета МСК на крысах

Таблица 16. Активность самцов крыс в тесте «Открытое поле» на 10-й день эксперимента (по окончании периода введения), $M \pm SD$

Гр. №	Объект исследования	Путь и схема введения	Доза	Количество, шт.	
				Посещенных квадратов	Пристеночных стоек
1	– (интактные)	–	–	24,0±4,12	10,4±3,21
2	Препарат на основе секрета МСК	Однократно, под белочную оболочку семенника	1,5 ТД	22,0±10,42	5,4±2,30
3			2,5 ТД	36,6±7,09	11,8±1,92
4			Плацебо	–	29,6±9,26
5	Препарат на основе секрета МСК	Множественно, внутримышечно	1,5 ТД	34,6±6,54	11,2±2,05
6			2,5 ТД	30,4±6,43	7,8±2,77
7			Плацебо	–	22,6±5,59

Таблица 17. Активность самцов крыс в тесте «Открытое поле» по окончании периода отсроченного наблюдения (38-й день эксперимента), $M \pm SD$

Гр. №	Объект исследования	Путь и схема введения	Доза	n	Количество, шт.	
					Посещенных квадратов	Пристеночных стоек
1	– (интактные)	–	–	10	26,8±6,83	8,8±3,68
2	Препарат на основе секрета МСК	Однократно, под белочную оболочку семенника	1,5 ТД	10	15,0±5,21	7,3±2,63
3			2,5 ТД	10	24,3±9,52	7,6±3,34
4			Плацебо	–	5	22,0±2,74
5	Препарат на основе секрета МСК	Многократно, внутримышечно	1,5 ТД	5	17,4±5,68	5,8±1,64
6			2,5 ТД	5	15,4±3,44	7,2±3,49
7			Плацебо	–	5	25,6±7,37

Таблица 18. Показатели общего анализа мочи самцов крыс по окончании периода введения (11-й день эксперимента)

Исследуемый показатель	Объект исследования / Путь и схема введения / Доза / n						
	– (интактные)	Препарат на основе секрета МСК		Плацебо	Препарат на основе секрета МСК		Плацебо
	Однократно, под белочную оболочку семенника				Множественно, внутримышечно		
	–	1,5 ТД	2,5 ТД	–	1,5 ТД	2,5 ТД	–
	5	5	5	5	5	5	5
Качественный анализ							
Билирубин	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный
Глюкоза	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный
Кровь	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный
Белок	++	отрицательный	++	+	++	++	отрицательный
Количественный анализ							
Белок, г/л (M±SD)	0,031±0,0113	0,024±0,0087	0,037±0,0144	0,029±0,0103	0,027±0,0102	0,039±0,017	0,025±0,0032
pH (Me (Q ₁ ; Q ₃))	6,25 (6,25; 6,50)	6,75 (6,50; 7,25)	6,50 (6,00; 6,50)	7,00 (6,50; 7,00)	7,50 (6,75; 7,50)	6,25 (6,25; 6,25)	6,50 (6,25; 6,50)
ОП (Me (Q ₁ ; Q ₃))	1,02 (1,02; 1,03)	1,03 (1,01; 1,03)	1,03 (1,02; 1,03)	1,02 (1,01; 1,02)	1,01 (1,01; 1,02)	1,04 (1,02; 1,04)	1,02 (1,02; 1,03)

Таблица 19. Показатели общего анализа мочи самцов крыс по окончании периода отсроченного наблюдения (39-й день эксперимента)

Исследуемый показатель	Объект исследования / Путь и схема введения / Доза / n						
	– (интактные)	Препарат на основе секрета МСК		Плацебо	Препарат на основе секрета МСК		Плацебо
	Однократно, под белочную оболочку семенника				Множественно, внутримышечно		
	–	1,5 ТД	2,5 ТД	–	1,5 ТД	2,5 ТД	–
	10	10	10	5	5	5	5
Качественный анализ							
Билирубин	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный
Глюкоза	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный
Кровь	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный
Белок	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный
Количественный анализ ((Me (Q ₁ ; Q ₃)))							
pH (Me (Q ₁ ; Q ₃))	6,63 (6,50; 6,75)	6,75 (6,75; 7,00)	6,88 (6,75; 7,25)	7,25 (7,25; 7,25)	6,25 (6,25; 6,50)	7,50 (7,50; 7,50)	7,00 (7,00; 7,25)
ОП (Me (Q ₁ ; Q ₃))	1,01 (1,01; 1,01)	1,01 (1,01; 1,02)	1,01 (1,01; 1,01)	1,01 (1,01; 1,01)	1,03 (1,01; 1,03)	1,01 (1,01; 1,01)	1,01 (1,01; 1,01)

Таблица 20. Гематологические показатели самцов крыс по окончании периода введения (13-й день эксперимента), M±SD

Исследуемый показатель	Объект исследования / Путь и схема введения / Доза / n						
	– (интактные)	Препарат на основе секретома МСК		Плацебо	Препарат на основе секретома МСК		Плацебо
	Однократно, под белочную оболочку семенника				Множественно, внутримышечно		
	–	1,5 ТД	2,5 ТД	–	1,5 ТД	2,5 ТД	–
	5	5	5	5	5	5	5
WBC, 10 ⁹ /л	13,1±1,17	12,9±2,26	11,5±2,15	10,4±1,20	11,7±2,29	11,2±1,22	11,7±2,12
LYM, %	73,1±4,76	77,2±8,04	78,9±3,62	79,2±3,53	79,4±3,88	77,8±4,61	75,3±3,07
MON, %	5,3±1,15	4,4±0,77	4,2±0,39	4,4±0,37	4,8±0,77	4,6±0,81	5,3±0,39
GRA, %	21,5±4,34	18,4±7,32	16,9±3,71	16,4±3,6	15,8±3,31	17,6±3,82	19,3±3,08
RBC, 10 ¹² /л	8,31±0,313	8,65±0,424	8,10±0,107	8,33±0,371	8,05±0,362	8,46±0,435	8,22±0,303
HGB, г/л	159±2,9	166±5,1	160±7,3	162±6,6	154±5,3	165±4,5	158±7,3
HCT, %	44,9±1,21	46,8±1,32	44,2±1,33	45,0±1,74	43,5±1,74	46,3±1,60	44,3±2,76
PLT, 10 ⁹ /л	719±21,4	761±50,1	749±74,8	766±138,2	744±87,5	810±181,0	813±47,2

Таблица 21. Гематологические показатели самцов крыс по окончании периода отсроченного наблюдения (41-й день эксперимента), $M \pm SD$

Исследуемый показатель	Объект исследования / Путь и схема введения / Доза / n						
	– (интактные)	Препарат на основе секретома МСК		Плацебо	Препарат на основе секретома МСК		Плацебо
	Однократно, под белочную оболочку семенника				Множественно, внутримышечно		
	–	1,5 ТД	2,5 ТД	–	1,5 ТД	2,5 ТД	–
	10	10	10	5	5	5	5
WBC, $10^9/\text{л}$	14,0±1,68	14,4±3,52	11,6±2,22	12,3±2,48	11,4±1,56	10,9±2,20	14,3±3,94
LYM, %	74,1±5,14	79,2±3,59 ^a	75,6±3,96	73,7±3,78	81,4±2,26	77,5±3,55	73,5±5,15
MON, %	4,8±0,92	4,8±1,17	4,5±0,65	4,7±0,54	4,1±0,52	5,3±1,26	5,6±1,18
GRA, %	21,1±4,61	16,0±3,21 ^a	20,0±3,60	21,6±3,65	14,5±1,84	17,2±3,51	20,8±5,78
RBC, $10^{12}/\text{л}$	8,43±0,450	8,67±0,388	8,77±0,482	8,46±0,194	8,32±0,429	8,47±0,396	8,34±0,598
HGB, г/л	161±7,4	159±2,9	163±5,8	158±1,8	156±2,4	158±3,6	156±5,6
HCT, %	44,5±1,94	44,5±0,67	45,4±1,62	43,8±0,48	43,2±0,81	44,1±1,16	43,4±1,56
PLT, $10^9/\text{л}$	798±94,4	802±103,5	835±73,3	813±123,7	785±50,7	799±70,4	843±84,3

Таблица 22. Биохимические показатели самцов крыс по окончании периода введения (14-й день эксперимента), M±SD

Исследуемый показатель	Объект исследования / Путь и схема введения / Доза / n						
	– (интактные)	Препарат на основе секретома МСК		Плацебо	Препарат на основе секретома МСК		Плацебо
	Однократно, под белочную оболочку семенника				Множественно, внутримышечно		
	–	1,5 ТД	2,5 ТД	–	1,5 ТД	2,5 ТД	–
	5	5	5	5	5	5	5
Креатинин, мкмоль/л	69,3±7,37	72,3±4,48	70,5±6,94	76,0±7,97	73,2±9,13	76,8±10,99	78,4±2,09
Мочевина, ммоль/л	5,21±0,824	5,51±0,386	4,69±0,353	5,23±0,75	5,14±0,349	5,64±0,719	6,80±0,766
АСТ, Ед/л	115,4±19,77	111,1±10,49	117,7±8,11	117,3±7,68	126,0±12,17	119,9±8,95	152,0±62,03
АЛТ, Ед/л	51,7±8,71	54,3±8,99	49,8±1,93	56,8±11,85	58,1±13,63	51,4±3,38	102,9±83,28
ЩФ, Ед/л	255±62,2	281±37,4	313±78,0	314±68,6	261±36,2	357±44,2	256±60,3
Холестерин, ммоль/л	1,95±0,184	1,77±0,373	2,03±0,487	2,23±0,203	2,33±0,156	2,12±0,355	2,44±0,528
Билирубин, мкмоль/л	1,55±0,351	2,18±0,237	2,13±0,358	2,19±0,340	2,53±0,310	2,55±0,178	2,77±0,261
Триглицериды, ммоль/л	0,96±0,254	0,72±0,104	0,74±0,096	0,77±0,097	0,77±0,057	1,09±0,292	0,84±0,100
Общий белок, г/л	67,2±2,06	67,0±4,05	69,1±7,15	74,1±2,72	76,5±2,92	73,9±5,62	80,4±3,32
Альбумин (А), г/л	30,6±1,38	31,4±1,76	33,7±3,84	36,9±2,20	35,9±1,50	38,1±2,25	39,2±2,04
Глобулины (G), г/л	36,6±0,97	35,6±3,56	35,4±3,94	37,2±2,07	40,5±2,06	35,8±6,50	41,2±3,01
Отношение А/G	0,8±0,03	0,9±0,10	1,0±0,08	1,0±0,09	0,9±0,05	1,1±0,25	1,0±0,10
КК, Ед/л	315±171,1	200±46,4	189±30,3	186±65,1	159±55,3	157±19,1	165±28,0
ЛДГ, Ед/л	260±81,6	207±21,6	235±40,0	212±51,9	213±40,2	244±66,6	224±20,0
Глюкоза, ммоль/л	6,4±0,69	6,4±0,34	6,4±0,34	6,1±0,57	6,1±0,74	6,6±0,31	6,0±0,36

Таблица 23. Биохимические показатели самцов крыс по окончании периода введения (42-й день эксперимента), M±SD

Исследуемый показатель	Объект исследования / Путь и схема введения / Доза / n						
	– (интактные)	Препарат на основе секретома МСК		Плацебо	Препарат на основе секретома МСК		Плацебо
	Однократно, под белочную оболочку семенника				Множественно, внутримышечно		
	–	1,5 ТД	2,5 ТД	–	1,5 ТД	2,5 ТД	–
	10	9	10	5	5	5	5
Креатинин, мкмоль/л	70,9±6,17	75,9±8,18	79,8±9,15	75,6±7,08	78,8±10,79	78,8±13,09	77,5±9,02
Мочевина, ммоль/л	6,17±0,446	5,74±0,951	5,98±1,243	6,83±1,931	7,60±1,112	7,06±1,228	7,33±1,372
АСТ, Ед/л	121,4±19,87	136,7±21,48	133,6±10,75	123,1±18,21	138,5±15,85	130,0±4,96	142,0±16,90
АЛТ, Ед/л	60,5±11,03	65,0±8,98	65,4±7,09	69,1±7,75	63,5±8,33	58,3±7,97	65,3±7,11
ЩФ, Ед/л	213±41,7	241±44,4	224±22,7	207±32,7	231±46,0	224±47,2	225±51,3
Холестерин, ммоль/л	2,20±0,229	2,01±0,226	2,12±0,242	2,41±0,351	2,35±0,300	2,31±0,417	2,52±0,193
Билирубин, мкмоль/л	2,02±0,710	1,38±0,378	1,60±0,259	1,18±0,239	1,31±0,284	1,10±0,359	1,45±0,311
Триглицериды, ммоль/л	0,78±0,171	0,65±0,365	0,70±0,272	0,89±0,199	1,04±0,401	0,90±0,333	1,09±0,278
Общий белок, г/л	71,8±2,12	70,2±4,19	71,3±4,63	80,0±3,94	80,5±2,75	78,0±1,44	82,1±6,04
Альбумин (А), г/л	31,7±2,43	30,9±2,65	32,6±1,63	36,4±3,59	35,9±2,50	37,0±3,03	39,1±3,10
Глобулины (G), г/л	40,1±3,17	39,4±4,26	38,7±3,42	43,7±4,10	44,6±3,58	41,0±2,55	43,0±4,35
Отношение А/G	0,8±0,11	0,8±0,12	0,8±0,05	0,8±0,15	0,8±0,11	0,9±0,13	0,9±0,11
КК, Ед/л	138±34,9	189±62,5	184±79,6	131±35,5	112±19,2	104±22,5	111±21,9
ЛДГ, Ед/л	222±54,1	282±70,8	293±80,3	243±45,4	239±70,6	247±51,3	265±40,1
Глюкоза, ммоль/л	5,4±0,48	5,9±0,66	5,7±0,37	5,9±0,39	5,7±0,40	5,6±0,24	5,3±0,43

Таблица 24. Эффективность оплодотворения крыс в различных группах

№ Гр.	Доза, УЕ/жив (объект)	Число ссаженных самок	Число оплодотворенных самок	Число беременных самок	ИП, %	ИБ, %	ОС, %
1	Интактные	20	20	19	100	95	95
2	Препарат на основе секрета МСК 1,5 ТД	20	20	17	100	85	85
3	Препарат на основе секрета МСК 2,5 ТД	20	20	14	100	70	70

Таблица 25. Пренатальное развитие потомства крыс, $M \pm SD$

Показатели	Объект исследования / доза		
	Интактные	Препарат на основе секрета МСК	
	—	1,5 ТД	2,5 ТД
	n=9	n=9	n=8
Количество желтых тел, $M \pm SEM$	12,0 \pm 0,60	14,1 \pm 1,00	12,9 \pm 1,34
Количество мест имплантации, $Me (Q_1; Q_3)$	6,0 (5,0;13,0)	12,0 (10,0;13,0)	11,0 (4,5;13,0)
Количество живых плодов, $Me (Q_1; Q_3)$	5,0 (3,0;8,0)	12,0 (10,0;13)	11,0 (4,5;13,0)
Число погибших плодов, $Me (Q_1; Q_3)$	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)
Пред-имплантационная смертность, $Me (Q_1; Q_3)$	5,0 (2,0;7,0)	1,0 (0,0;6,0)	3,5 (0,5;7,0)
Пост-имплантационная смертность, $Me (Q_1; Q_3)$	0,0 (0,0;2,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)

Приложение 2. Результаты исследования общей токсичности препарата на основе секретомы МСК на кроликах

Таблица 26. Результаты общего анализа мочи кроликов на 29-й и 58-й дни эксперимента, $M \pm SD$

№ гр	Объект исследования	Доза	29-й день эксперимента		58-й день эксперимента	
			pH	Относительная плотность	pH	Относительная плотность
1	Интактная группа	-	8,0 (8,0;8,5)	1,072 (1,060;1,080)	7,5 (7,5;8,0)	1,064 (1,060;1,072)
2	Плацебо	-	8,5 (8,0;8,5)	1,066 (1,060;1,080)	8,0 (8,0;8,5)	1,068 (1,064;1,070)
3	Препарат на основе секретомы МСК	ТД	9,0 (8,0;9,0)	1,072 (1,064;1,074)	8,5 (8,0;9,0)	1,080 (1,080;1,086)
4		1,5 ТД	8,0 (7,0;8,5)	1,080 (1,072;1,088)	8,0 (7,5;8,5)	1,074 (1,068;1,082)
5		2,5 ТД	8,0 (7,5;8,5)	1,076 (1,064;1,080)	8,0 (7,5;8,0)	1,060 (1,060;1,076)

Таблица 27. Биохимические показатели анализа мочи и клиренс креатинина, М±SD

Исследуемые показатели	Интактная группа	Плацебо	Препарат на основе секрета МСК		
	-	-	ТД	1,5 ТД	2,5 дозы ТД
29-й день эксперимента					
Креатинин, мкмоль/л, М(SD)	7575±409,1	13081±1051,4	9116±585,6	8146±1138,2	11392±1455,3
Мочевина, ммоль/л, М(SD)	399±24,7	609±57,7	482±34,0	497±51,6	576±41,3
Клиренс креатинина, мл/мин, Me (Q1;Q3)	0,5 (0,5;0,5)	0,8 (0,5;1,3)	0,4 (0,3;0,4)	0,3 (0,3;0,5)	1,0 (0,8;1,0)
58-й день эксперимента					
Креатинин, мкмоль/л, М(SD)	9129±2243,5	9325±1665,9	10946±3716,1	8781±1140,0	7260±2048,5
Мочевина, ммоль/л, М(SD)	449±81,6	465±31,2	495±102,3	458±44,0	312±84,7
Клиренс креатинина, мл/мин, Me (Q1;Q3)	0,6 (0,4;0,7)	0,7 (0,3;0,8)	0,3 (0,2;1,1)	0,5 (0,3;0,5)	0,4 (0,3;0,8)

Таблица 28. Гематологические показатели самцов кроликов, 30-й день эксперимента, М±SD

Исследуемые показатели	Интактная группа	Плацебо	Препарат на основе секрета МСК		
	-	-	1 ТД	1,5 ТД	2,5 ТД
WBC Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,4±1,73	7,4±2,49	6,7±1,12	6,1±1,02	6,4±0,84
LYM Лимфоциты, %	64,6±5,87	57,8±13,56	58,8±6,23	64,7±12,58	59,7±3,46
MON Моноциты, %	3,2±0,70	3,4±1,02	3,1±0,61	3,0±0,47	3,0±0,29
GRA Гранулоциты, %	32,2±5,80	38,7±12,79	38,1±6,61	32,4±12,95	37,4±3,18
LYM Лимфоциты, 10 ⁹ /л	4,8±1,34	4,0±0,08	3,9±0,69	3,9±0,70	3,8±0,31
MON Моноциты, 10 ⁹ /л	0,2±0,09	0,3±0,19	0,2±0,08	0,2±0,00	0,2±0,04
GRA Гранулоциты, 10 ⁹ /л	2,3±0,49	3,1±2,30	2,5±0,74	2,0±1,03	2,4±0,50
RBC Эритроциты, 10 ¹² /л	6,4±0,42	6,1±0,44	5,9±0,39	6,2±0,36	6,2±0,72
HGB Гемоглобин, г/л	154,2±11,73	147,2±10,57	142,6±9,07	144,0±8,00	147,6±10,64
HCT Гематокрит, %	34,5±2,64	33,2±2,38	32,0±2,12	32,5±1,75	33,2±2,41
PLT Тромбоциты, 10 ⁹ /л	331,6±27,96	426,4±130,92	423,4±46,43	378±190,04	336,2±67,49

Таблица 29. Гематологические показатели самцов кроликов, 59-й день эксперимента, M±SD

Исследуемые показатели	Интактная группа	Плацебо	Препарат на основе секрета МСК		
	-	-	ТД	1,5 ТД	2,5 ТД
WBC Лейкоциты, 10 ⁹ /л	6,3±0,82	6,3±1,33	6,9±1,57	6,6±1,23	6,6±0,90
LYM Лимфоциты, %	69,9±7,39	65,8±8,51	58,3±9,92	66,8±6,63	67,6±10,76
MON Моноциты, %	2,3±0,30	2,8±0,65	2,9±0,88	2,3±0,38	2,9±0,62
GRA Гранулоциты, %	27,8±7,47	31,4±8,32	38,8±9,93	30,9±6,45	29,5±10,23
LYM Лимфоциты, 10 ⁹ /л	4,4±0,96	4,1±0,79	4,0±0,79	4,4±1,16	4,4±0,56
MON Моноциты, 10 ⁹ /л	0,2±0,05	0,2±0,08	0,2±0,13	0,2±0,05	0,2±0,07
GRA Гранулоциты, 10 ⁹ /л	1,7±0,39	2,0±0,86	2,7±1,10	2,0±0,29	2,0±1,00
RBC Эритроциты, 10 ¹² /л	6,6±0,40	6,1±0,18	6,7±0,17 ^B	6,3±0,26	6,6±0,33
HGB Гемоглобин, г/л	154,8±6,10	148,6±6,58	155,6±3,05	149,2±4,27	156,2±8,87
HCT Гематокрит, %	35,1±1,18	33,6±1,54	35,1±0,86	33,6±0,96	34,6±1,94
PLT Тромбоциты, 10 ⁹ /л	307,4±71,65	282,2±106,61	370,8±48,77	326,8±22,97	327,0±24,2

Таблица 30. Показатели системы гемостаза самцов кроликов, M±SD

№ гр	Объект исследования	Доза	3-й день эксперимента, n=10			30-й день эксперимента, n=5			59-й день эксперимента, n=5		
			АЧТВ, с	ПВ, с	Фибриноген, г/л	АЧТВ, с	ПВ, с	Фибриноген, г/л	АЧТВ, с	ПВ, с	Фибриноген, г/л
1	Интактная группа	-	12,3±1,47	10,1±0,87	2,4±0,37	11,3±0,88	9,1±0,38	2,4±0,16	11,3±1,33	8,0±0,42	5,1±0,42
2	Плацебо	-	13,0±1,12	10,1±0,84	2,4±0,28	14,1±0,62	9,1±0,48	2,4±0,10	10,2±2,02	7,7±0,41	4,7±0,39
3	Препарат на основе секрета МСК	ТД	12,9±1,28	9,4±0,47	2,4±0,24	13,3±3,07	9,3±0,81	2,3±0,12	11,8±1,22	8,7±0,27	4,8±0,68
4		1,5 ТД	13,4±1,09	8,6±0,47	2,3±0,21	11,8±1,71	9,5±0,40	2,4±0,08	11,3±0,68	8,9±0,43	4,8±1,00
5		2,5 ТД	14,3±1,17	8,6±0,45	2,2±0,23	14,4±1,32	9,0±0,33	2,4±0,11	10,8±1,36	8,7±0,64	4,6±0,51

Таблица 31. Биохимические показатели крови самцов кроликов, 3-й день эксперимента, M±SD

Исследуемые показатели	Интактная группа	Плацебо	Препарат на основе секрета МСК		
	-	-	ТД	1,5 ТД	2,5 ТД
Альбумин (А), г/л	51,5±4,68	47,8±5,57	49,6±5,46	53,0±4,75	51,9±4,95
Общий белок, г/л	66,7±3,92	66,5±5,31	67,0±3,09	68,3±4,82	67,9±2,50
Глобулины (G), г/л	15,1±3,79	18,7±4,45	17,5±5,24	15,3±3,16	16,1±4,8
Отношение А/G	3,7±1,27	2,7±0,85	3,1±1,21	3,7±1,61	3,6±1,32
Щелочная фосфатаза, Ед/л	98,1±38,04	111,9±35,55	51,9±26,21	102,9±45,44	75,0±21,99
Аланинаминотрансфераза, Ед/л	42,8±14,81	65,5±45,6	54,7±21,58	49,2±15,79	48,7±9,52
Аспаратаминотрансфераза, Ед/л	26,6±13,08	26,2±12,78	30,8±15,67	29,2±14,67	27,8±12,53
Холестерин, ммоль/л	0,8±0,24	1,1±0,75	0,8±0,43	0,9±0,38	0,8±0,41
Креатинкиназа Ед/л	1021,2±464,67	1532,7±701,66	1519,9±752,09	1399,3±848,16	1355,6±558,22
Креатинин, мкмоль/л	107,3±12,81	104,3±15,97	107,4±13,02	112,9±16,46	117,9±19,90
Глюкоза, ммоль/л	8,4±1,31	8,0±0,64	8,0±1,01	8,2±0,66	8,8±1,31
Лактатдегидрогеназа, Ед/л	176,9±85,26	194,5±157,01	272,7±103,13	212,1±87,51	325,1±216,19
Триглицериды, ммоль/л	0,9±0,42	1,1±0,65	0,8±0,59	0,7±0,29	0,7±0,26
Мочевина, ммоль/л	7,2±1,39	6,8±1,13	6,6±1,38	7,4±1,36	6,8±1,39
Билирубин общий, мкмоль/л	1,8±1,51	2,5±1,49	1,9±1,27	2,1±1,06	2±1,21

Таблица 32. Биохимические показатели крови самцов кроликов, 30-й день эксперимента, M±SD

Исследуемые показатели	Интактная группа	Плацебо	Препарат на основе секрета МСК		
	-	-	ТД	1,5 ТД	2,5 ТД
Альбумин (А), г/л	53,3±1,56	49,6±4,10	54,2±1,54	55,5±1,20	56,4±4,58
Общий белок, г/л	64,2±2,89	63,8±5,37	65,5±1,96	67,2±4,86	67,1±7,72
Глобулины (G), г/л	11,0±3,13	14,2±5,40	11,3±1,20	11,6±5,98	10,6±3,89
Отношение А/G	5,3±2,06	4,0±1,99	4,8±0,57	5,5±1,96	6,1±2,74
Щелочная фосфатаза, Ед/л	145,2±16,89	62,6±50,36	76,8±26,53	124,2±80,29	128,0±50,04
Аланинаминотрансфераза, Ед/л	51,7±9,94	68,7±11,35	62,1±15,42	56,6±24,95	61,3±13,25
Аспаратаминотрансфераза, Ед/л	25,2±4,96	34,7±8,62	33,8±8,32	38,1±18,91	31,3±13
Холестерин, ммоль/л	0,9±0,34	1,1±0,58	0,9±0,65	0,8±0,14	0,9±0,24
Креатинкиназа Ед/л	1064,0±214,87	1393,2±477,43	1005,8±236,23	1006,0±311,72	1214,8±404,84
Креатинин, мкмоль/л	97,9±11,05	93,0±17,31	98,5±20,63	117,6±10,29	116,2±29,57
Глюкоза, ммоль/л	7,6±1,14	7,8±0,82	7,7±0,60	9,0±0,90	8,2±0,24
Лактатдегидрогеназа, Ед/л	124,2±11,86	220,6±128,80	205,6±93,80	180,8±75,38	216,6±90,28
Триглицериды, ммоль/л	0,6±0,20	1,2±0,93	1,1±0,68	0,9±0,47	0,7±0,20
Мочевина, ммоль/л	7,0±1,37	6,8±0,34	6,3±0,65	6,9±1,54	8,5±2,02
Билирубин общий, мкмоль/л	1,3±0,29	1,7±0,50	2,2±1,67	2,3±0,41	2,4±1,25

Таблица 33. Биохимические показатели крови самцов кроликов, 59-й день эксперимента, M±SD

Исследуемые показатели	Интактная группа	Плацебо	Препарат на основе секрета МСК		
	-	-	ТД	1,5 ТД	2,5 ТД
Альбумин (А), г/л	55,1±2,52	54,6±3,73	54,6±4,12	52,9±3,33	53,9±2,25
Общий белок, г/л	64,3±3,05	61,5±3,66	63,7±1,12	62,0±0,99	63,5±3,82
Глобулины (G), г/л	9,2±1,37	6,9±1,70	9,1±5,12	9,1±3,31	9,6±2,56
Отношение А/G	6,1±0,80	8,4±2,28	7,6±4,02	6,6±2,77	5,9±1,38
Щелочная фосфатаза, Ед/л	55,2±30,33	125,6±89,72	102,8±42,15	91,8±46,12	164,6±41,65
Аланинаминотрансфераза, Ед/л	36,8±8,80	46,3±6,29	42,6±7,65	41,0±12,29	47,2±8,43
Аспаргатаминотрансфераза, Ед/л	22,6±4,08	25,9±6,30	24,0±9,06	18,6±2,44	22,8±6,19
Холестерин, ммоль/л	0,9±0,20	0,9±0,06	0,9±0,17	1,1±0,20	1,1±0,27
Креатинкиназа Ед/л	1472,2±725,46	1235,8±606,86	1350,8±465,71	1000,4±408,51	987,4±242,14
Креатинин, мкмоль/л	118,6±8,42	119,8±9,60	123,5±14,58	117,7±11,70	133,2±19,52
Глюкоза, ммоль/л	8,5±1,12	7,2±0,40	7,6±0,82	7,6±0,71	7,4±0,58
Лактатдегидрогеназа, Ед/л	301,4±130,68	249,2±105,56	282,4±139,71	223,0±73,65	193,4±77,78
Триглицериды, ммоль/л	0,8±0,23	1,2±0,79	0,7±0,22	1,9±1,57	1,2±1,20
Мочевина, ммоль/л	7,9±1,35	8,9±1,31	9,3±1,57	8,5±0,99	9,2±1,68
Билирубин общий, мкмоль/л	1,5±0,22	1,7±0,88	1,5±0,20	1,1±0,58	2,4±1,05

Таблица 34. Показатели газового состава крови самцов кроликов, 30-й день эксперимента, M±SD

Исследуемые показатели	Интактная группа	Плацебо	Препарат на основе секрета МСК		
	-	-	ТД	1,5 ТД	2,5 ТД
pCO ₂ Парциальное давление углекислого газа, мм рт ст	28,6±2,67	28,5±4,66	26,3±4,41	25,7±3,25	29,8±2,11
pO ₂ Парциальное давление кислорода, мм рт ст	83,6±10,95	82,4±3,58	89,6±14,38	97,4±12,54	81,8±11,90
sO ₂ Насыщение гемоглобина кислородом, %	95,0±4,00	96,8±0,45	96,4±1,52	97,2±1,10	95,6±1,67

Таблица 35. Показатели газового состава крови самцов кроликов, 59-й день эксперимента, M±SD

Исследуемые показатели	Интактная группа	Плацебо	Препарат на основе секрета МСК		
	-	-	ТД	1,5 ТД	2,5 ТД
pCO ₂ Парциальное давление углекислого газа, мм рт ст	24,7±3,16	27,5±4,10	26,7±4,71	27,8±1,53	25,0±4,61
pO ₂ Парциальное давление кислорода, мм рт ст	101,0±5,96	90,0±13,32	93,0±11,38	88,6±5,18	95,0±11,38
sO ₂ Насыщение гемоглобина кислородом, %	98,0±0,00	96,8±1,10	97,6±0,89	97,2±0,84	97,2±1,10

Таблица 36. Параметры ЭКГ по окончании введения, $M \pm SD$

Объект исследования	Доза	Показатели ЭКГ					
		ЧСС, уд/мин	RR, мсек	P, мсек	PQ, мсек	QRS, мсек	QT, мсек
Интактная группа	-	249,8±42,61	245,2±37,51	35,4±5,27	69,8±14,74	47,6±2,41	136,8±8,67
Плацебо	-	199,4±33,48	300,2±54,55	36,8±2,59	64,2±5,89	48,2±4,21	136,8±5,81
Препарат на основе секретома МСК	ТД	227,8±33,03	268,2±40,23	38,2±3,27	65,4±3,36	47,0±5,05	138,6±5,59
	1,5 ТД	214,4±46,32	290,4±60,48	37,2±2,95	71,2±5,31	48,6±2,3	149,4±17,07
	2,5 ТД	215,8±30,14	282,0±35,80	35,4±5,13	67,0±1,0	49,4±2,41	145,0±9,08

Таблица 37. Параметры ЭКГ по окончании периода отсроченного наблюдения, $M \pm SD$

Объект исследования	Доза	Показатели ЭКГ					
		ЧСС, уд/мин	RR, мсек	P, мсек	PQ, мсек	QRS, мсек	QT, мсек
Интактная группа	-	249,2±14,31	241,2±13,55	34,6±5,41	61,6±4,62	52,4±11,84	134,0±12,79
Плацебо	-	248,0±10,42	242,4±9,91	35,2±4,44	60,0±3,67	47,4±1,95	138,6±10,26
Препарат на основе секретома МСК	ТД	232,8±9,01	258,2±9,88	36,6±2,41	64,0±4,0	48,6±0,55	145,8±9,98
	1,5 ТД	234,8±9,78	256,6±11,04	38,0±3,67	60,2±6,02	51,6±4,51	140,8±7,76
	2,5 ТД	230,8±11,65	260,6±13,58	40,6±7,27	67,6±3,58	47,2±2,77	141,8±5,72

Таблица 38. Регистрация САД у самцов кроликов, $M \pm SD$

Исследуемые показатели	Интактная группа	Плацебо	Препарат на основе секретома МСК		
	-	-	ТД	1,5 ТД	2,5 ТД
28-й день эксперимента					
САД, мм рт ст	102,2±23,87	91,4±24,91	97,6±17,59	83,6±21,05	101,8±17,33
57-й день эксперимента					
САД, мм рт ст	67,4±21,97	81,0±27,65	73,2±14,58	87,8±15,61	76,6±15,58

Таблица 39. Регистрация ЧДД у самцов кроликов, М±SD

Исследуемые показатели	Интактная группа	Плацебо	Препарат на основе секретома МСК		
	-	-	ТД	-	ТД
28-й день эксперимента					
ЧДД/мин	51,2±15,29	54,0±16,91	51,4±7,73	74,0±24,73	66,8±21,92
57-й день эксперимента					
ЧДД/мин	46,4±13,22	48,6±14,29	60,0±11,47	56,6±16,65	60,2±15,16

Таблица 40. Температура тела самцов кроликов, 1-й и 28-й дни эксперимента, °С, М±SD

№ гр	Объект исследования	Доза	1-й день эксперимента		28-й день эксперимента	
			До введения	Через 3 часа после введения	До введения	Через 3 часа после введения
1	Интактная группа	-	39,1±0,33	39,2±0,33	38,9±0,24	39,0±0,20
2	Плацебо	-	38,8±0,30	38,9±0,26	38,9±0,28	38,9±0,31
3	Препарат на основе секретома МСК	ТД	38,9±0,31	39,0±0,32	38,9±0,35	38,8±0,27
4		1,5 ТД	39,1±0,30	39,1±0,30	39,0±0,31	39,0±0,35
5		2,5 ТД	38,8±0,31	38,9±0,29	39,0±0,30	39,1±0,29

Таблица 41. Спермограмма самцов кроликов на 31-й день эксперимента

Исследуемые показатели	Интактная группа	Плацебо	Препарат на основе секрета МСК		
	-	-	ТД	1,5 ТД	2,5 ТД
M(SD)					
Количество сперматозоидов, шт	776,8±152,76	683,0±374,79	626,2±230,89	596,0±202,46	813,3±27,32
Me (Q1;Q3)					
Количество подвижных сперматозоидов, %	86,8 (82,0;92,0)	13,2 (8,0;18,0)	89,0 (84,0;95,0)	9,8 (5,0;14,0)	1,2 (0,0;2,0)
Количество неподвижных сперматозоидов, %	73,2 (0,0;94,0)	6,8 (0,0;11,0)	74,0 (0,0;95,0)	5,2 (0,0;9,0)	0,8 (0,0;3,0)
Количество живых сперматозоидов, %	87,0 (80,0;93,0)	13,0 (7,0;20,0)	91,0 (84,0;96,0)	8,6 (4,0;15,0)	0,4 (0,0;1,0)
Количество мертвых сперматозоидов, %	84,8 (72,0;94,0)	15,2 (6,0;28,0)	90,6 (85,0;94,0)	8,4 (5,0;13,0)	1,0 (0,0;2,0)
Количество незрелых сперматозоидов, %	91,4 (88,0;95,0)	8,6 (5,0;12,0)	93,6 (89,0;97,0)	5,6 (3,0;9,0)	0,8 (0,0;2,0)

Таблица 42. Спермограмма самцов кроликов на 60-й день эксперимента

Исследуемые показатели	Интактная группа	Плацебо	Препарат на основе секрета МСК		
	-	-	ТД	1,5 ТД	2,5 ТД
M(SD)					
Количество сперматозоидов, шт	928,6±276,93	972,6±211,37	877,6±146,69	812,0±262,42	937,8±125,27
Me (Q1;Q3)					
Количество подвижных сперматозоидов, %	89,2 (84,0;92,0)	10,8 (8,0;16,0)	91,2 (86,0;94,0)	7,8 (6,0;11,0)	1,0 (0,0;3,0)
Количество неподвижных сперматозоидов, %	90,2 (82,0;95,0)	9,8 (5,0;18,0)	92,0 (85,0;96,0)	6,8 (4,0;13,0)	1,2 (0,0;2,0)
Количество живых сперматозоидов, %	85,2 (80,0;90,0)	14,8 (10,0;20,0)	88,2 (83,0;94,0)	10,6 (6,0;15,0)	1,2 (0,0;3,0)
Количество мертвых сперматозоидов, %	87,6 (80,0;93,0)	12,4 (7,0;20,0)	89,8 (83,0;93,0)	8,8 (4,0;15,0)	1,4 (0,0;3,0)
Количество незрелых сперматозоидов, %	87,2 (79,0;93,0)	12,8 (7,0;21,0)	87,8 (82,0;93,0)	10,4 (5,0;16,0)	1,8 (0,0;3,0)

Приложение 3. Титульный лист брошюры исследователя

Конфиденциально

Брошюра исследователя № MSU 001
Версия 1.1. от 03.05.2024

БРОШЮРА ИССЛЕДОВАТЕЛЯ

Наименование Спонсора	ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова адрес: 119991, Российская Федерация, Москва, территория Ленинские горы, д. 1. тел.: +7 (495) 939-10-00 e-mail: info@rector.msu.ru
Наименование организационно-разработчика лекарственного препарата	МНОЦ ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова адрес: 119991, Российская Федерация, Москва, Ломоносовский проспект, д.27, кор.10. тел.: +7 (495) 531-27-72 e-mail: info@mc.msu.ru
Номер клинического исследования	№ MSU 001
Название исследования	Открытое одноцентровое исследование переносимости, безопасности, фармакокинетики, фармакодинамики и предварительной эффективности лекарственного препарата МедиПер [®] (Секретом мезенхимных стромальных клеток человека), лиофилизат для приготовления раствора для инъекций у пациентов с тяжелыми нарушениями сперматогенеза.
Торговое наименование	МедиПер [®]
Лекарственная форма, дозировка	лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 1,0 мл/доза
Группировочное наименование	Секретом мезенхимных стромальных клеток человека
Версия Брошюры	1.1
Дата составления Брошюры	03.05.2024
Предыдущая версия и дата пересмотра Брошюры организатором исследования	Исходная версия брошюры от 18.11.2023 Дата пересмотра 03.05.2024

Заявление о конфиденциальности

Данный документ содержит конфиденциальную информацию. Эта информация предназначена для лиц, отвечающих за проведение и организацию исследования, и может быть предоставлена им при условии согласия этих лиц на дальнейшее нераспространение этой информации. Неопубликованная информация, содержащаяся в этом документе, не может быть раскрыта без предварительного письменного разрешения ФФМ ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова.

Данный документ подготовлен в соответствии с Федеральным законом Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 79 «Об утверждении Правил надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза», Приказом Минздрава России от 01.04.2016 №200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики», Национальным стандартом Российской Федерации «Надлежащая клиническая практика» ГОСТ Р 52379-2005.

Оглавление

Приложение 4. Разрешение на проведение клинических исследований препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток человека

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РАЗРЕШЕНИЕ № 328
на проведение клинических исследований
от 14 августа 2024 г.

Настоящим разрешается проведение клинических исследований
МедиPer® (Секретом мезенхимных стромальных клеток человека)
(наименование лекарственного препарата)

Организация, осуществляющая организацию проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения
разработчик лекарственного препарата Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Россия, 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

Лекарственная форма и дозировка лекарственного препарата для медицинского применения: **лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 1 мл/доза**

Наименование протокола клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **№ MSU 001 «Открытое одноцентровое исследование переносимости, безопасности, фармакокинетики, фармакодинамики и предварительной эффективности лекарственного препарата МедиPer® (Секретом мезенхимных стромальных клеток человека), лиофилизат для приготовления раствора для инъекций у пациентов с тяжелыми нарушениями сперматогенеза»**

Цель клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **изучение переносимости, безопасности, фармакокинетики, фармакодинамики и эффективности лекарственного препарата МедиPer® у пациентов с тяжелыми нарушениями сперматогенеза**

Сроки проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **с 14.08.2024 по 30.09.2024**

Количество пациентов, принимающих участие в клиническом исследовании лекарственного препарата для медицинского применения: **100 пациентов**

012519