

МОНАКОВА АННА ОЛЕГОВНА

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ СЕКРЕТОМА
МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ
НАРУШЕНИЙ СПЕРМАТОГЕНЕЗА**

1.5.4. Биохимия

3.3.6. Фармакология и клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена на кафедре биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины и в Центре регенеративной медицины МНОИ МГУ имени М.В.Ломоносова

Ефименко Анастасия Юрьевна

Научные руководители: доктор медицинских наук, доцент, профессор РАН, заведующая лабораторией репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины, доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины, Медицинский научно-образовательный институт МГУ имени М.В. Ломоносова

Балабаньян Вадим Юрьевич

доктор фармацевтических наук, доцент, ведущий научный сотрудник Институт трансляционной медицины, лаборатория химии лекарственных субстанций НИИ трансляционной медицины ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова

Официальные оппоненты:

Ярыгин Константин Никитич

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клеточной биологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

Гудашева Татьяна Александровна

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, руководитель отдела химии лекарственных средств, заведующий лабораторией пептидных биорегуляторов, главный научный сотрудник ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»

Михайлова Наталья Аркадьевна

доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник, заведующая Центром клеточных технологий Института цитологии РАН

Защита состоится «27» апреля 2026 года на заседании диссертационного совета ПДС 0300.025 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6)

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Электронные версии диссертации и автореферата размещены на сайте РУДН по адресу: <https://www.rudn.ru/science/dissovet> и отправлены для размещения на официальном сайте ВАК при Минобрнауки России: <https://vak.minobrnauki.gov.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.025
доктор биологических наук, профессор

Лукашева Елена Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В России и 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. В последнем случае причина неизвестна, что осложняет выбор терапии. В связи с отсутствием доказанной причины современное лечение мужского бесплодия предполагает использование вспомогательных репродуктивных технологий или эмпирической медикаментозной терапии (Kharazi U, Badalzadeh R., 2020). 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 противоречивы. В некоторых случаях экспериментально используют фолликулостимулирующий гормон, однако мета-анализ также показал отсутствие значимого эффекта. Стоит отметить, что в большинстве случаев применение перечисленных препаратов происходит в режиме off-label и не имеет сильной доказательной базы (Chen G et.al., 2023). 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.

Степень разработанности темы исследования. В большинстве случаев мужское бесплодие связано с повреждением сперматогониальных стволовых клеток (ССК) и их специфического микроокружения — ниши, которое обеспечивает правильную регуляцию дифференцировки и функционирования стволовых клеток (Sagaradze G. et al., 2022). 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 (Sagaradze G. et al., 2019). 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 (Е.В. Галицына и др., 2024). Полученные данные позволяют в перспективе предлагать биологический лекарственный препарат на основе секретомы МСК как эффективный и безопасный для лечения мужского бесплодия. Однако животная модель крипторхизма является физиологической и частично обратимой, поэтому важно исследовать эффективность препарата на основе секретомы МСК на принципиально другой модели с тяжёлыми нарушениями сперматогенеза, например, токсического генеза. Для этой цели мы отработали модель токсического повреждения сперматогенеза доксорубицином и впервые

изучили клеточные и молекулярные механизмы терапевтического действия секретома МСК на этой модели.

Полученные результаты позволили установить первичную клеточную мишень препарата на основе секретома МСК, определить вклад наиболее значимых факторов в составе секретома 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 последующего клинического применения препарата на основе секретома МСК необходимо было изучить его общую и специфическую токсичность. Для решения этой задачи были проведены исследования безопасности препарата при системном и локальном введении на грызунах и кроликах.

Цель работы — исследовать эффективность и безопасность препарата на основе секретома мезенхимных стромальных клеток человека (МСК) для восстановления сперматогенеза. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

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

Научная новизна работы. Впервые установлена перспективность применения оригинального отечественного препарата на основе секретома МСК человека для коррекции нарушений сперматогенеза на модели токсического повреждения доксорубицином. Выявлены возможные молекулярно-клеточные мишени и механизмы, опосредующие фармакологические эффекты препарата на основе секретома МСК. Предложен метод биологической стандартизации препарата на основе секретома 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 секретома МСК. Изучены основные внутриклеточные сигнальные механизмы, опосредующие действие секретома МСК на клетках Лейдига *in vitro*. Впервые исследован профиль безопасности влияния препарата на основе секретома МСК человека на нескольких видах животных.

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.

Предложены 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.

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.)

Методология и методы исследования. Регуляторные исследования выполнены в соответствии с принципами GLP OECD (ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики») и Решением Совета Евразийской Экономической комиссии №81 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» от 03.11.2016 г. В исследовании 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.

Положения, выносимые на защиту

1. Препарат на основе секрета МСК человека способен восстанавливать нарушения сперматогенеза, вызванные доксорубицином в эксперименте.

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

Апробация исследования. Работа выполнялась в рамках проектов государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова «Фармацевтическая разработка, доклиническое и клиническое исследования лекарственного препарата на основе секретома 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 работы были представлены на следующих конференциях: Национальный конгресс по регенеративной медицине, Международный молодежный научный форум «Ломоносов», ISCOMS, VII Молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, Международный конгресс CRISPR-2023.

На основании данных, полученных в работе, опубликованы 9 статей, 4 из которых опубликованы в журналах, индексируемых в МБЦ Scopus и Web of Science. По результатам исследования опубликован 1 патент Российской Федерации. Также результаты работы были представлены в 24 тезисах.

Достоверность научных достижений. 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 современными методами с использованием программы GraphPad Prism 10.

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

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа выполнена на 140 страницах компьютерного текста, содержит 42 таблицы, 22 рисунка. Структура работы включает: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и терминов, практические рекомендации, список литературы, и приложения. Список

литературы содержит 160 источников. Диссертация оформлена в соответствии с общими требованиями к оформлению кандидатских и докторских диссертаций, утвержденными в ГОСТ Р 7.0.11-2011.

Материалы и методы исследования

Получение МСК из жировой ткани человека

МСК от разных доноров были взяты из биобанка Центра регенеративной медицины МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, который пополняется согласно разрешению институционального локального этического комитета (Этический комитет МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, IRB00010587) (протокол № 4, дата заседания 04.06.2018), с получением добровольного информированного согласия у всех доноров.

Получение секрета МСК

Для получения секрета использовали МСК жировой ткани человека пятого пассажа, достигшие 80% конfluenceности. Для концентрирования секрета МСК использовали фильтры-концентраторы с размером пор, предназначенным для отсеивания молекул размером меньше 10 кДа. Концентрированный в 50 раз раствор либо замораживали при температуре -80°C , либо дозировали во флаконы и лиофилизировали, затем помещали на хранение при температуре от $+2$ до $+8^{\circ}\text{C}$.

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.). Важным компонентом секрета МСК являются регуляторные РНК (микроРНК-21, микроРНК-29с и др.) в составе внеклеточных везикул.

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.

Экспериментальные животные в исследовании безопасности секрета МСК

1. Оценка общетоксических свойств секрета МСК и местной переносимости

Эксперимент проводили на крысах линии Wistar со стандартными весовыми характеристиками. Препарат на основе секрета МСК вводили локально под белочную оболочку яйца в дозах, превышающих терапевтическую дозу (ТД) в 1,5 (1,5 ТД) и 2,5 раза (2,5 ТД). Для изучения

системной токсичности крысам вводили препарат внутримышечно. В качестве контрольного вещества в обоих экспериментах вводили среду роста ДМЕМ с низкой глюкозой. Эвтаназию животных проводили на 14-й день — по 5 животных каждой группы, на 42-й день — оставшихся животных. У животных проводили клиническое наблюдение, оценку потребления корма и воды, оценку поведения, общий анализ мочи, гематологический анализ, биохимический анализ крови, оценку спермограммы.

2. Исследование репродуктивной (генеративной) токсичности

Самцов крыс ссаживали с самками крыс линии Wistar (15 самцов и 20 самок в каждой группе). Препарат на основе секрета МСК вводили самцам локально под белочную оболочку яичка в дозах, превышающих терапевтическую дозу (ТД) в 1,5 (1,5 ТД) и 2,5 раза (2,5 ТД). Далее проводили спаривание, определяли день беременности, наблюдали за родами и развитием потомства.

3. Изучение иммунотоксичности

Эксперимент проводили на мышах линии C57Bl/6 со стандартными весовыми характеристиками. Для изучения гуморального, клеточного и неспецифического иммунного ответа были сформированы группы интактных животных и группы животных, которым внутримышечно вводили препарат на основе секрета МСК в дозах ниже (0,75 ТД) и выше (1,25 ТД) терапевтической дозы.

4. Исследования общетоксических свойств, местной переносимости и фармакологической безопасности на кроликах

Препарат на основе секрета МСК вводили кроликам двукратно локально под белочную оболочку яичка в терапевтической дозе (ТД) и в дозах, превышающих терапевтическую дозу (ТД) в 1,5 (1,5 ТД) и 2,5 раза (2,5 ТД). Группе плацебо вводили двукратно под белочную оболочку яичка коллаген Аппликолл в смеси с водой для инъекций (4:1). Эвтаназию животных проводили на 31-й день и на 60-й день эксперимента. У животных проводили клиническое наблюдение, оценку потребления корма и воды, оценку поведения, общий анализ мочи, гематологический анализ, биохимический анализ крови, оценку спермограммы, макроскопическое и микроскопическое исследование органов и тканей. В рамках исследования фармакологической безопасности оценивали функциональное состояние центральной нервной системы, состояние системы гемостаза, газовый состав крови, проводили регистрацию электрокардиограммы, частоты сердечных сокращений, артериального давления и частоты дыхательных движений.

Экспериментальные животные и модели для определения эффективности и выбора суррогатного фактора, отражающего фармакологическую активность секрета МСК

Работа выполнена на зрелых самцах мышах линии C57Bl/6 возраста 3,5–4,0 месяцев со стандартными весовыми характеристиками. Для изучения эффективности препарата на основе секрета МСК и выявления суррогатного фактора были сформированы следующие группы (N=6):

«интактные» (без манипуляций), «без терапии» (с повреждением сперматогенеза без испытуемого образца), «препарат на основе секрета МСК» (с повреждением сперматогенеза с последующей инъекции испытуемого образца), «препарат сравнения» (с повреждением сперматогенеза с последующей инъекции токоферола ацетата), «препарат на основе секрета МСК + АТ VEGF» (с повреждением сперматогенеза с последующей инъекцией испытуемого образца, в котором перед лиофилизацией секрета МСК VEGF заблокировали нейтрализующими антителами к VEGF), «препарат на основе секрета МСК + изоАТ VEGF» (с повреждением сперматогенеза с последующей инъекцией испытуемого образца, в котором перед лиофилизацией секрета МСК добавлены контрольные изотипические антитела к VEGF), «препарат на основе секрета МСК + АТ GDNF» (с повреждением сперматогенеза с последующей инъекцией испытуемого образца, в котором перед лиофилизацией секрета МСК GDNF заблокировали нейтрализующими антителами к GDNF), «препарат на основе секрета МСК + изоАТ GDNF» (с повреждением сперматогенеза с последующей инъекцией секрета МСК, в котором перед лиофилизацией секрета МСК добавлены контрольные изотипические антитела к GDNF). После эвтаназии (через 5 недель и через 5 месяцев после введения препарата) у самцов фиксировали семенники и забирали придатки для дальнейшего анализа.

Морфометрический анализ сперматозоидов. В ходе некропсии у животных извлекали правый придаток. Затем придаток взвешивали и измельчали в 200 мкл 10% раствора глюкозы. На предметное стекло наносили 10 мкл спермы, каплю накрывали покровным стеклом (22×22 мм). Подсчитывали число сперматозоидов в поле зрения. Спермограмму оценивали по следующим показателям: общее количество сперматозоидов ($\times 10^6/\text{мл}$), характер движения: доля подвижных и неподвижных сперматозоидов.

Гистологический анализ. Во время эвтаназии у самцов забирали семенники для гистологического исследования. Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина (24 часа), затем по общепринятой методике заливали в парафин и изготавливали гистологические срезы толщиной 5–7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимический анализ. Гистологические срезы семенников толщиной 1 мкм депарафинизировали, демаскировали в 0,1М цитратном буфере или в Tris буфере в течение 20 минут при 98°C. Проводили мечение мишеней антителами, согласно протоколам производителей. В исследовании использованы следующие антитела и красители: DAPI, антитела против PCNA, LHR, CD 206 и CD163, alpha-SMA, SOX-9, CD90.

Изучение биораспределения. Анализ локального биораспределения препарата на основе секрета МСК изучали на интактных мышах и мышах с токсическим моделированием нарушений сперматогенеза путём введения коллагена «Апликолл» или рекомбинантного GFP с коллагеном «Апликолл» с последующей эвтаназией животных через 1 час и выделением

семенников. Полученные семенники помещали в среду для заморозки с последующей заморозкой в жидком азоте и получением криосрезов.

Выделение фракции, обогащенной клетками Лейдига, из яичек грызунов. После эвтаназии у крысы или у мыши половозрелого возраста забирали семенники. В чашке Петри промывали оставшиеся после снятия белочной оболочки семенные каналы раствором Хэнкса с 5% антибиотиком пенициллин-стрептомицин. Затем каналы переносили в стерильную пробирку, добавляли среду ДМЕМ, содержащую трипсин и дезоксирибонуклеазу, и инкубировали при температуре 34-35°C. Добавляли среду, ингибирующую действие ферментов: ДМЕМ + 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС). Затем оставляли пробирку в вертикальном положении для осаждения канальцев, жидкость над канальцами содержала суспензию, обогащенную клетками Лейдига. После оседания канальцев жидкость над канальцами отбирали в новую пробирку. Повторяли отмывку 5 раз. Полученную суспензию, обогащенную клетками Лейдига, центрифугировали при 300g в течение 10 мин, сливали надосадочную жидкость, осадок пипетировали в среде ДМЕМ-Ф12 + 2%ФБС + 1x инсулин-трансферрин-селенита (ITS), фильтровали полученную суспензию через фильтр 100 мкм и высаживали клетки в 48-луночный планшет.

Оценка специфической активности секрета МСК *in vitro* на клетках Лейдига и выявление ключевого фактора секрета МСК для стимуляции стероидогенеза

Клетки Лейдига после выделения рассаживали в лунки 48 луночного планшета в укомплектованной среде роста ДМЕМ/F12, 1x ITS и 2% ФБС. На следующий день проводили смену среды. В лунках группы «контроль 2 дня» клетки после отмывок ставили на кондиционирование — добавляли среду ДМЕМ с низким содержанием глюкозы (1 г/л) без фенолового красного. 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: среду ДМЕМ с низкой глюкозой без фенолового красного (контроль 4 день), секретом МСК, секретом МСК с нейтрализующими антителами к VEGF, секретом МСК с контрольными неспецифическими антителами, секретом МСК с ингибитором микроРНК-21, секретом МСК с ингибиторными контрольными олигонуклеотидами, мимик микроРНК-21 с трансфекцией клеток Лейдига липофектамином, 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 иммуоферментного анализа (DVC, Канада).

Определение количества ключевых компонентов в секрете МСК

1) Иммуноферментный анализ

Содержание фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в образцах секрета МСК определяли с помощью коммерческого набора согласно протоколу производителя.

2) Оценка уровня микроРНК с помощью количественной ПЦР в реальном времени

Тотальную РНК выделяли и очищали с использованием специализированных сорбционных колонок. Количество и чистоту выделенной РНК определяли на спектрофотометре Nanodrop. Обратную транскрипцию выполняли с использованием набора miScript II RT Kit. ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора miScript SYBR Green PCR Kit и системы для проведения ПЦР в реальном времени QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific). Уровни экспрессии генов рассчитывали относительно экспрессии генов домашнего пользования сравнительным методом deltaCT.

Вестерн блоттинг

Клетки Лейдига лизировали в буфере Лэммли. Количество белка в лизате определяли с помощью метода анализа белка микроBCA. Лизаты, содержащие равное количество белка, подвергали электрофорезу в геле и переносили на мембрану PVDF. Мембраны блокировали обезжиренным молоком и последовательно инкубировали с первичными и вторичными антителами в течение ночи при 4°C. Меченые белки визуализировали с помощью системы визуализации ChemiDoc™ Touch с использованием набора для усиленной хемилюминесценции.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Результаты исследования

1. Изучение ответа ниши сперматогониальной стволовой клетки (ССК) на повреждение на модели токсического повреждения сперматогенеза доксорубицином

В результате оптимизации модели токсического повреждения доксорубицином установлено, что введение доксорубицина гидрохлорида внутривентрально в дозе 1 мг/кг с периодичностью раз в два дня (до суммарной дозы 10 мг/кг) приводит к необратимому повреждению ниши ССК.

В результате чего семенные каналы самостоятельно не восстанавливаются ни через 5 недель, ни через 5 месяцев (рис. 1А).

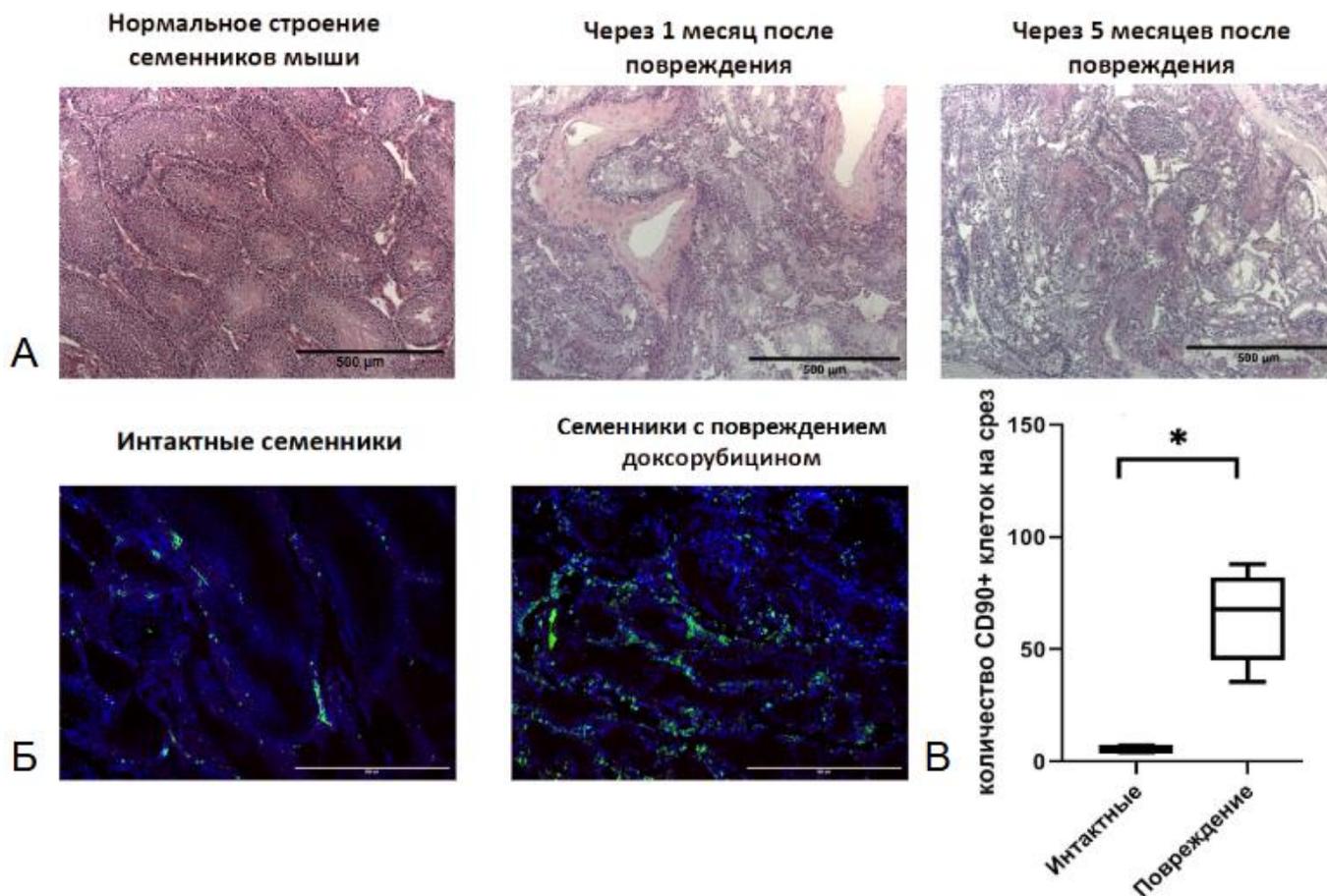


Рис. 1. Оценка ответа ниши ССК на повреждение сперматогенеза доксорубицином у мышей.

А. Гистологическая картина интактных семенников мыши и 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 процентиль. * $p < 0,05$.

В результате повреждения ниши ССК доксорубицином количество резидентных CD90+ МСК увеличивается, что, по-видимому, является компенсаторной реакцией на повреждение (рис. 1Б, 1В). Однако, даже десятикратное 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.

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

На модели токсического повреждения сперматогенеза установлено, что введение препарата на основе секрета МСК через 5 недель и через 5 месяцев не приводит к восстановлению: количество повреждённых, восстанавливающихся и нормальных канальцев значимо не изменяется по сравнению с группой с повреждением без терапии (рис. 2).

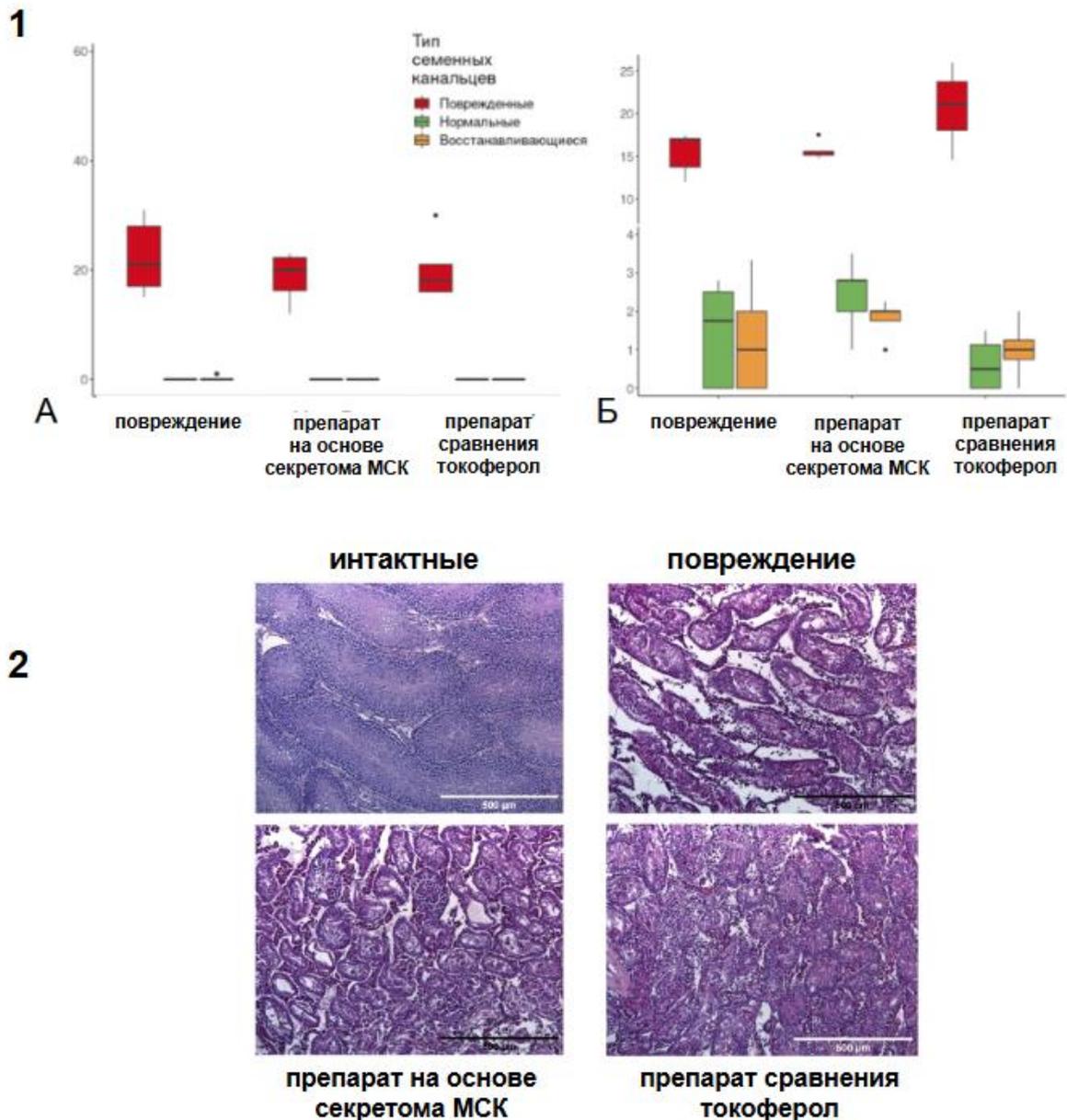


Рис. 2. Гистологическая картина семенных канальцев значительно не изменяется после введения препарата на основе секрета МСК на модели токсического повреждения сперматогенеза у мышей.

1. 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. А — через 5 недель, Б — через 5 месяцев. 2. Гистологическая картина яичек мыши через 5 недель, окраска гематоксилином и эозином. Масштабная линейка отмечает 500 мкм.

По результатам морфометрического анализа сперматозоидов 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. 3), что показывает эффективность препарата на основе секрета МСК на данной модели.

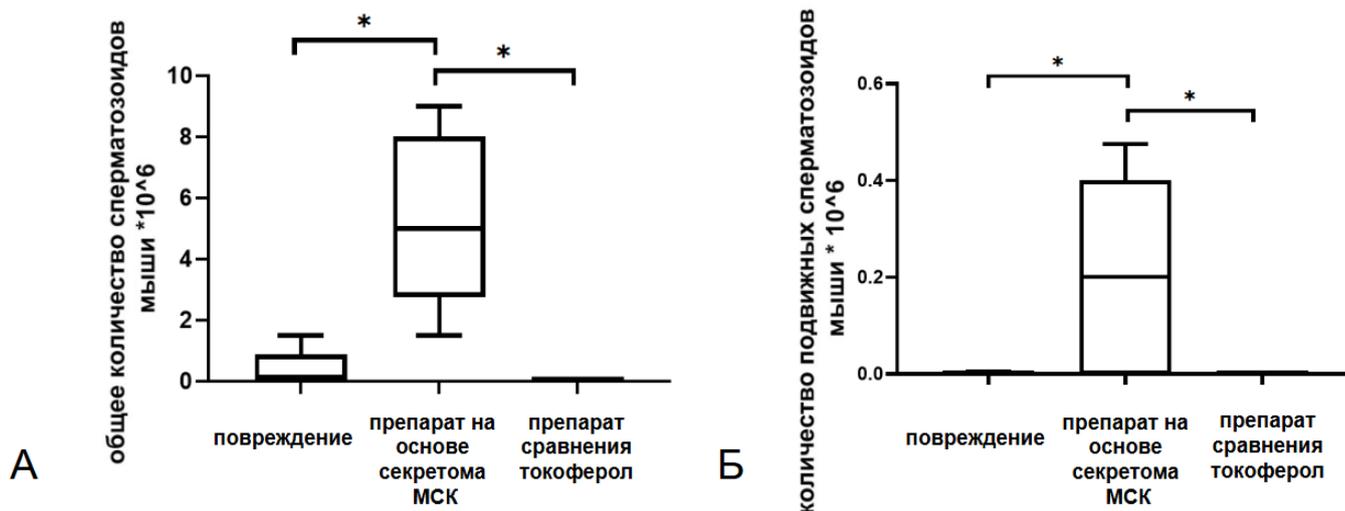


Рис. 3. Препарат на основе секретома МСК способствует восстановлению сперматогенеза на модели токсического повреждения сперматогенеза у мышей. А. Общее количество сперматозоидов*10⁶, Б. Количество подвижных сперматозоидов*10⁶ на 1 мл гомогената через 5 месяцев после введения препарата на основе секретома МСК или препарата сравнения токоферола. Данные представлены как медиана и 25-й и 75-й процентиль. * $p < 0,05$.

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

Имуногистохимический 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 секретома МСК наблюдается тенденция к увеличению активно делящихся ССК, что может косвенно отражать процесс восстановления процесса сперматогенеза (рис. 4).

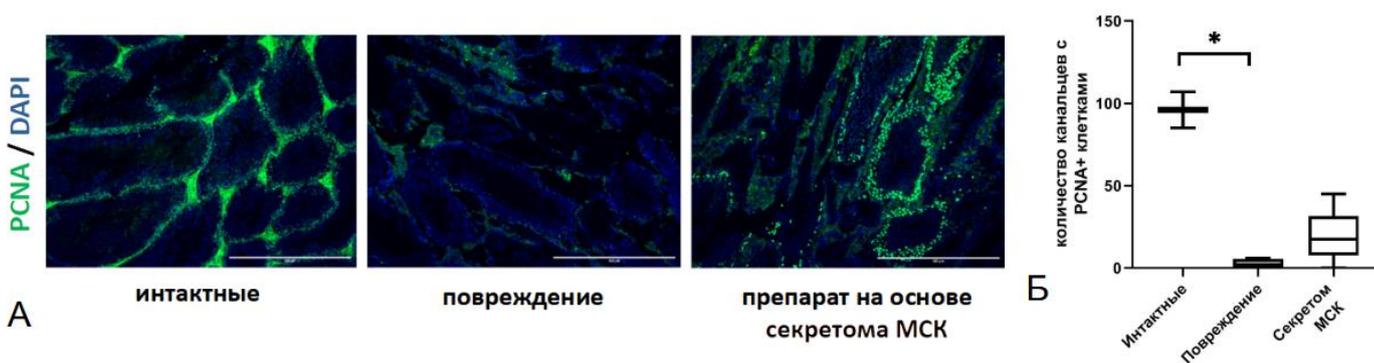


Рис. 4. Оценка влияния препарата на основе секретома МСК на количество ССК на модели токсического повреждения сперматогенеза у мышей. А. Иммуногистохимический анализ экспрессии PCNA в семенниках мыши. Зелёный псевдоцвет — окраска PCNA. Масштабный отрезок отмечает 200 мкм. Б. Количество семенных канальцев с PCNA+ клетками. Данные представлены как медиана и 25-й и 75-й процентиль. * $p < 0,05$.

Количество SOX9+ клеток Сертоли при повреждении компенсаторно увеличивается, возможно за счёт миграции из близлежащих областей (Sagaradze, et.al. 2019). Введение препарата на основе секретома МСК значимо не влияет на количество клеток Сертоли (рис. 5).

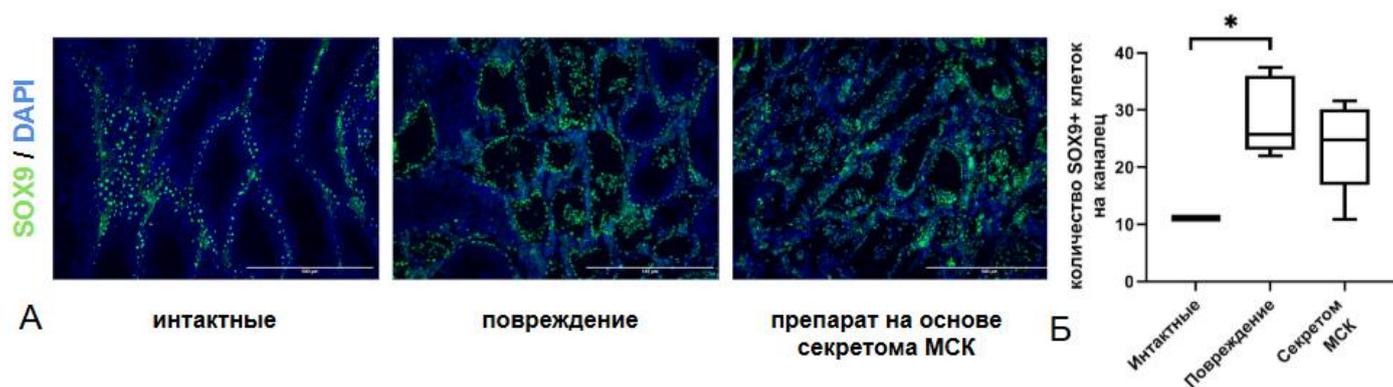


Рис. 5. Оценка влияния препарата на основе секретома МСК на количество клеток Сертоли на модели токсического повреждения сперматогенеза у мышей. А. Иммуногистохимический анализ экспрессии маркера клеток Сертоли SOX9+ в семенниках мыши. Зелёный псевдоцвет — окраска SOX 9. Масштабный отрезок отмечает 200 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.

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

Для выявления первичной клеточной мишени препарата на основе секретома МСК в нише ССК *in vivo* был проведён анализ локального биораспределения препарата на основе секретома МСК при введении под белочную оболочку яичка. Для этого intactным мышам или мышам с токсическим нарушением сперматогенеза вводили коллаген или смесь коллагена с GFP. Было показано, что локализация препарата через час после введения происходит, главным образом, в интерстиции (рис. 6А-6Г).

При введении свиного коллагена интратестикулярно крысам и кроликам было показано, что в месте введения наблюдаются полости между единичными канальцами, в которых, по-видимому, сохраняется коллаген (рисунок 6Д-6З). Распространения коллагена в другие тканевые компартменты не наблюдали. Таким образом, основная мишень секретома МСК может быть расположена в интерстиции. Поскольку около 80% интерстиция занимают клетки Лейдига, они могут являться первичной клеточной мишенью секретома МСК.

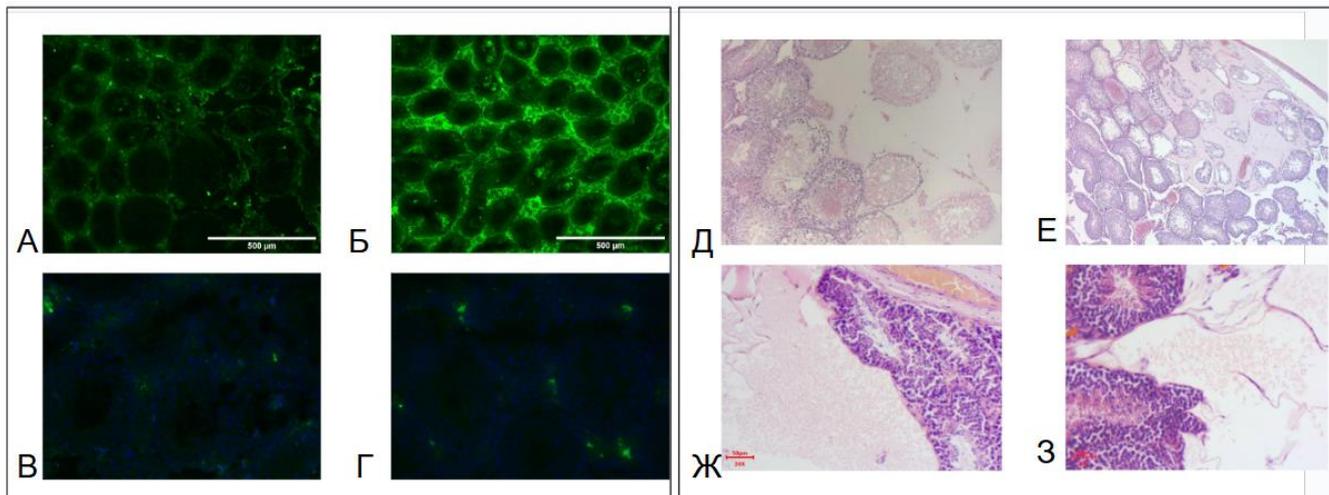


Рис. 6. Оценка биораспределения компонентов препарата на основе секретома МСК при введении под белочную оболочку семенников экспериментальных животных. А-Г: Оценка биораспределения препарата при введении под белочную оболочку яичка мыши с помощью моделирования белкового состава секретома МСК смесью рекомбинантного GFP со свиным коллагеном. А – введение коллагена животным с токсическим повреждением сперматогенеза; Б - введение комбинации коллаген + GFP животным с токсическим повреждением сперматогенеза; С - введение коллагена интактным животным; Д - введение 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).

5. Оценка влияния секретома МСК на клетки Лейдига *in vitro*.

Для оценки влияния секретома МСК 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, секретируемого клетками Лейдига, выше, чем в точке «контроль 4 день». Это связано с тем, что при культивировании способность клеток Лейдига к продукции тестостерона значительно снижается.

Показано, что секретом МСК значительно стимулирует секрецию тестостерона клетками Лейдига относительно отрицательного контроля 4 дня и секретома стромальных клеток — фибробластов (рис. 7А), что говорит о специфичности действия. Данная модель была валидирована и легла в основу показателя для стандартизации биологического препарата на основе секретома МСК — специфической активности. На данной модели установлена дозозависимость эффекта: при увеличении концентрации секретома МСК увеличивается концентрация тестостерона, выделяемого клетками Лейдига. При концентрировании секретома МСК больше, чем в 10 раз, эффект стремится выйти на плато (рис. 7Б).

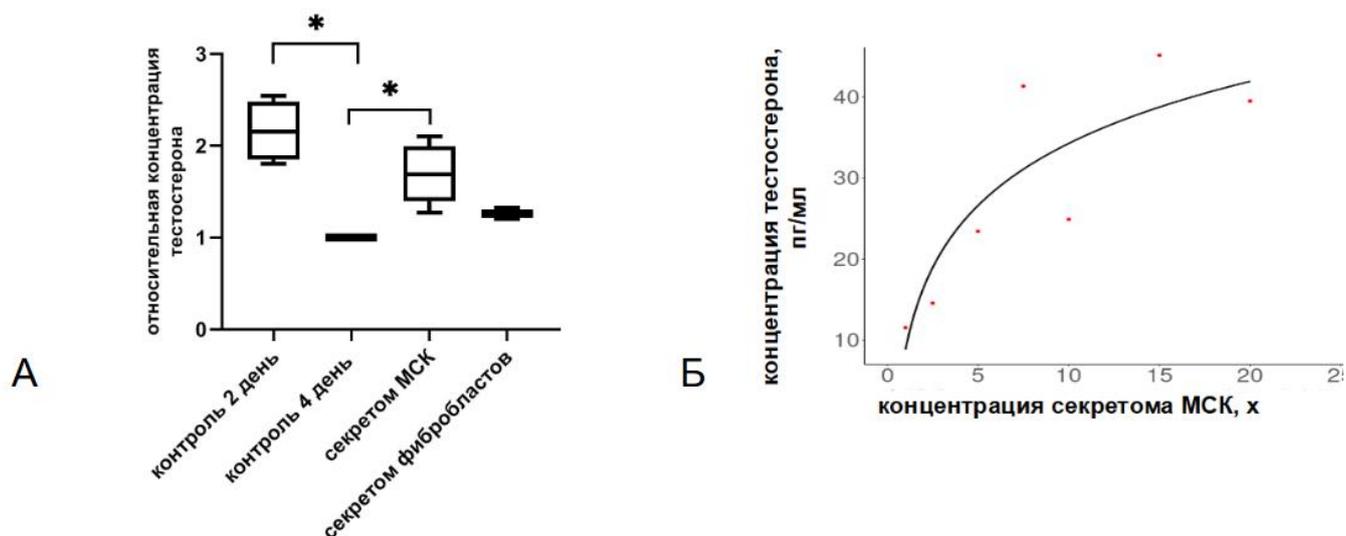


Рис. 7. Оценка действия секрета МСК на модели на клетках Лейдига.

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 (х).

6. 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. Наиболее высокопредставленными в секрете МСК человека и зачастую участвующими в регенерации ниши факторами являются VEGF и GDNF. Ингибиторный анализ с использованием нейтрализующих антител к VEGF или GDNF 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 в качестве суррогатного фактора, отражающего фармакологическую активность секрета МСК (рис. 8).

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

Возможной клеточной мишенью VEGF может быть первичная мишень секрета МСК — клетки Лейдига. При блокировании нейтрализующими антителами VEGF наблюдается лишь тенденция к снижению эффекта секрета МСК на клетках Лейдига (рис. 9А). Однако была установлена возможность действия VEGF на клетки Лейдига, поскольку показано присутствие рецептора VEGF 2 типа (VEGFR2) на клетках Лейдига (рис. 9В). Дальнейшее блокирование VEGFR2 на клетках Лейдига привело к выраженной тенденции снижения эффекта секрета МСК: концентрация тестостерона была ниже по сравнению с концентрацией после нанесения

секретома МСК на клетки Лейдига (рис. 9Б). Это может указывать на возможную вовлечённость VEGFR2 в реализацию эффекта секретома МСК на клетках Лейдига.

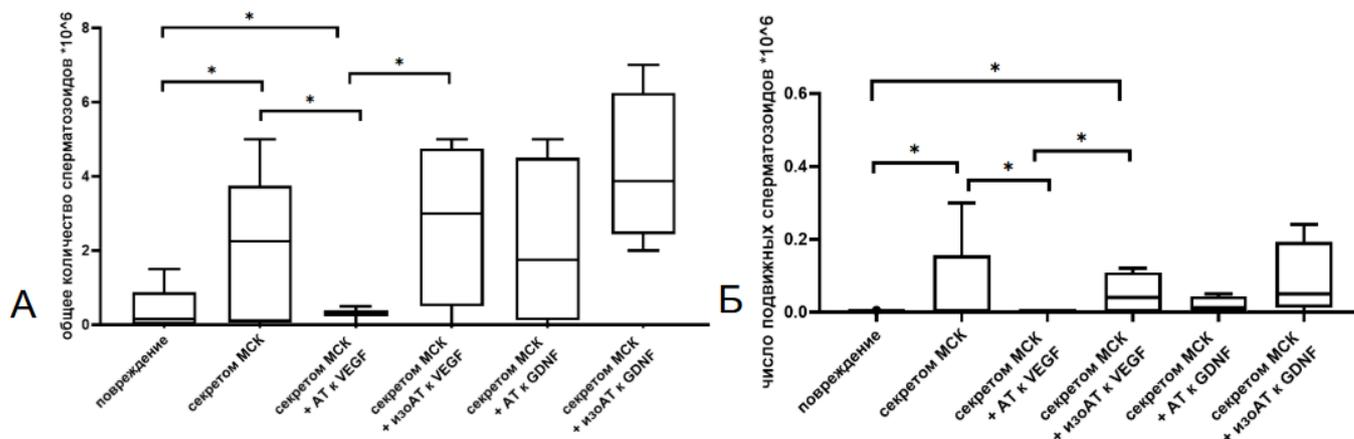


Рис. 8. Оценка вклада компонентов секретома МСК VEGF и GDNF в фармакологическую активность препарата на основе секретома МСК по восстановлению сперматогенеза. На рисунках отражено количество сперматозоидов $\cdot 10^6$ на 1 мл гомогената через 5 месяцев после инъекции препарата на основе секретома МСК. А. Общее количество сперматозоидов после введения препарата на основе секретома МСК или секретома 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 секретома МСК или секретома МСК с блокирующими антителами к VEGF или GDNF, либо изотипическими антителами. Данные представлены в виде медианы и 25-го и 75-го перцентилей. $*p < 0,05$.

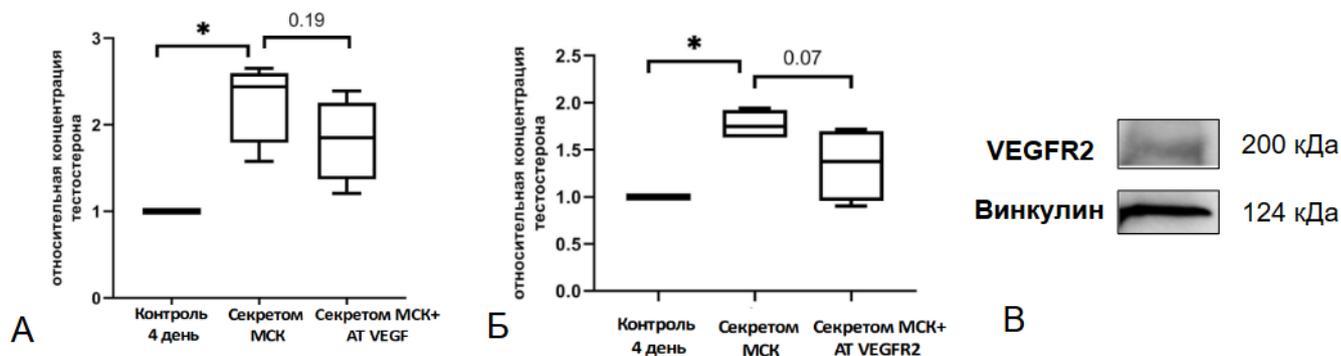


Рис. 9. Оценка вклада VEGF в составе секретома МСК в стимуляцию стероидогенеза клетками Лейдига. А. Относительная концентрация тестостерона в среде клеток Лейдига после добавления секретома МСК или секретома МСК с нейтрализующими антителами VEGF к клеткам Лейдига (значения контроля 4 дня приняты за единицу). Данные представлены в виде медианы и 25-го и 75-го перцентилей. Б. Относительная концентрация тестостерона в среде клеток Лейдига после добавления секретома МСК к интактным клеткам Лейдига или к клеткам Лейдига с заблокированным антителами рецептором VEGFR2 (значения контроля 4 дня приняты за единицу). Данные представлены в виде медианы и 25-го и 75-го перцентилей. $*p < 0,05$. В. Вестерн-блоттинг для анализа наличия VEGFR2 в клетках Лейдига.

Как было показано ранее, в состав секретома МСК, помимо факторов роста, входят регуляторные РНК, включая микроРНК. Одной из самых представленных микроРНК в составе секретома МСК является микроРНК-21. Мы изучили роль микроРНК-21 в составе секретома

МСК при действии на клетки Лейдига. Блокирование микроРНК-21 в секрете МСК приводит к снижению стимулирующего эффекта секрета МСК на клетки Лейдига (рис. 10А). Добавление к клеткам Лейдига микроРНК-21 значительно стимулирует продукцию тестостерона клетками Лейдига (рис. 10Б). Таким образом, микроРНК-21, по-видимому, является критичным компонентом секрета МСК для реализации влияния на клетки Лейдига.

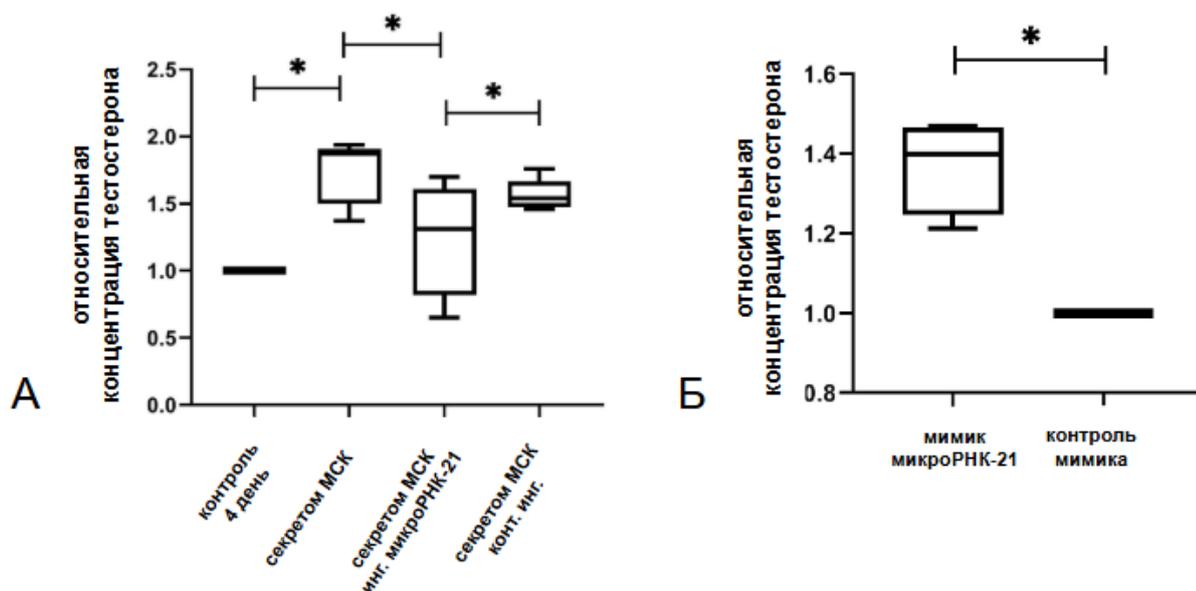


Рис. 10. Оценка вклада микроРНК-21 в составе секрета МСК в стимуляцию стероидогенеза клетками Лейдига. А. Относительная концентрация тестостерона в среде клеток Лейдига (значения контроля 4 дня приняты за единицу) после добавления секрета МСК, секрета МСК с ингибитором микроРНК-21 или секрета МСК с ингибиторными контрольными олигонуклеотидами. Данные представлены в виде медианы и 25-го и 75-го перцентилей. * $p < 0,05$. N=5. Б. Относительная концентрация тестостерона в среде клеток Лейдига, трансфицированных мимиком микроРНК-21 или контрольными олигонуклеотидами (отрицательный контроль). Данные представлены в виде медианы и 25-го и 75-го перцентилей. * $p < 0,05$. N=5.

8. Изучение аспектов внутриклеточного сигналинга в клетках Лейдига

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. 11).

В результате биоинформатического поиска были выявлены возможные внутриклеточные мишени в клетках Лейдига при действии одного из ключевых компонентов секрета МСК — микроРНК-21. 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, BMPR2, FOXO3. Несмотря на наличие мишеней, антагонистичных по функции, конечный эффект микроРНК-21 проявляется в увеличении секреции тестостерона клетками Лейдига, что было показано ранее.

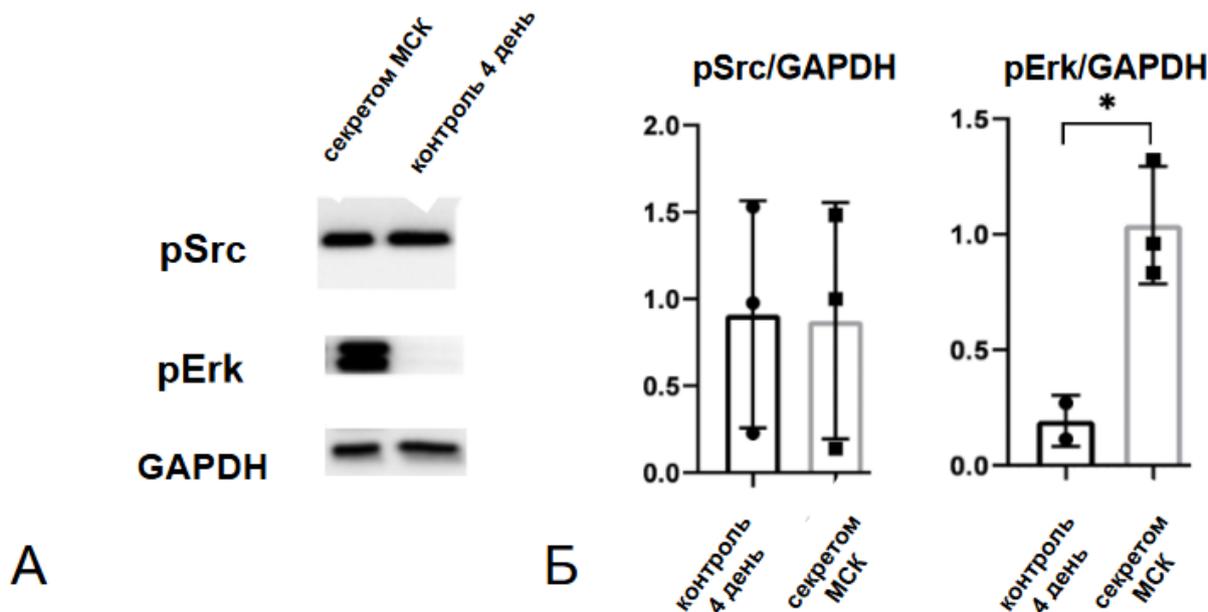


Рис. 11. Оценка активации основных внутриклеточных сигнальных путей в клетках Лейдига при добавлении секретомы МСК. А. Вестерн-блоттинг, pSrc и pERK, N=3. Б. Относительные единицы значений вестерн-блоттинга на pSrc и pERK, N=3. Данные представлены в виде медианы и 25-го и 75-го процентилей. * $p < 0,05$.

8. Исследование общей безопасности препарата на основе секретомы МСК на грызунах.

Изучение безопасности препарата на основе секретомы МСК проводили на двух типах животных — грызуны (крысы и мыши) и негрызуны (кролики). Случаев гибели и интоксикации животных после введения препарата на основе секретомы МСК не зарегистрировано. Влияния секретомы МСК на остальные анализируемые показатели не обнаружено.

Общая токсичность при локальном введении крысам под белочную оболочку яичка

У единичных самцов, получающих препарат на основе секретомы МСК или контрольное вещество (среду ДМЕМ с низкой глюкозой), 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 плацебо, они были отнесены к спонтанным, не связанным с введением исследуемого препарата.

Общая токсичность при многократном внутримышечном введении на крысах

При многократном внутримышечном введении тестируемого препарата наблюдали изменение в поведении: тенденцию к снижению количества посещенных квадратов, которое достигло статистической значимости в дозе, в 2,5 раза превышающей терапевтическую (2,5 ТД). При биохимическом анализе крови выявлена тенденция к увеличению активности щелочной фосфатазы у животных с введением препарата или контрольного вещества (среда ДМЕМ с низкой глюкозой). В отсроченном периоде значения щелочной фосфатазы нормализовались.

Местная переносимость у крыс при локальном введении под белочную оболочку яичка

Секретом МСК и контрольное вещество при однократном введении под белочную оболочку семенника оказали умеренное местно-раздражающее действие, выражающееся в атрофии эпителия и застое спермы в семенных канальцах. Также у некоторых животных дополнительно наблюдали дегенеративные изменения эпителия с деформированными клетками Сертоли и мелкими очагами обызвествления. Патологические изменения затрагивали лишь единичные семенные канальцы (рис.12).

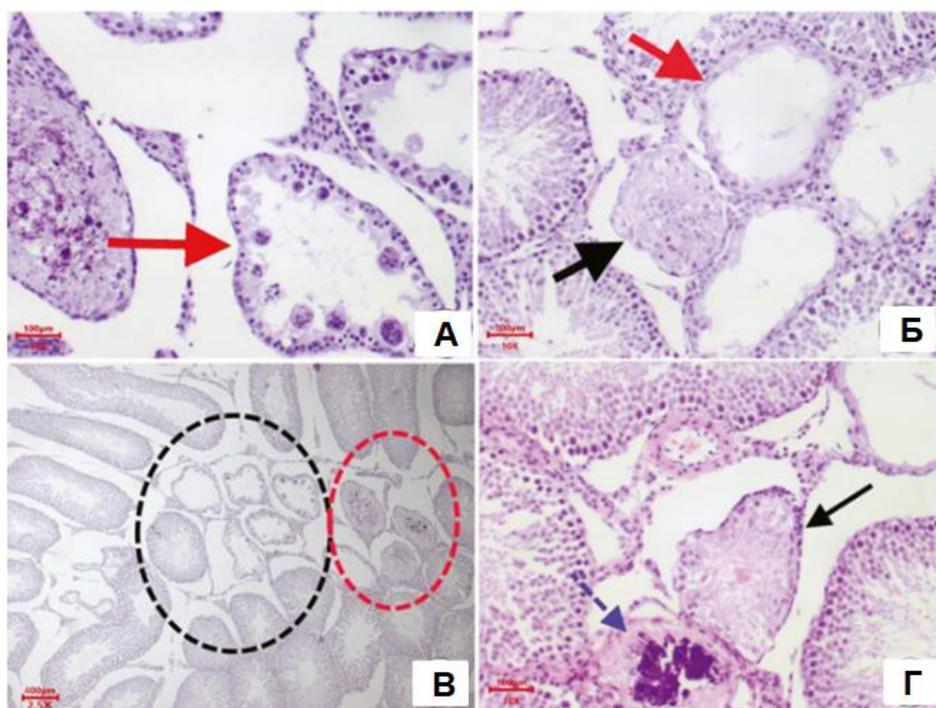


Рис. 12. Изучение влияния препарата на основе секрета МСК при локальном введении под белочную оболочку яичка самцам крыс. На рисунках представлены срезы семенников самцов крыс, 14 сут эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. (А) красной стрелкой отмечен каналец с дегенеративными изменениями эпителия, с деформированными клетками Сертоли. (Б) красной стрелкой отмечен каналец с атрофическими изменениями эпителия, черной — каналец с застоем спермы. (В) Черным овалом отмечены каналцы с дегенеративными изменениями эпителия, 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.

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

Общая токсичность при локальном введении кроликам под белочную оболочку яичка

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 иммунотоксических свойств, пирогенности, репродуктивной токсичности и туморогенности.

Местная переносимость у кроликов при локальном введении под белочную оболочку яичка

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. Канальцы вдоль стенки полости деформированы в результате сдавливания, но без признаков дистрофических нарушений сперматогенного эпителия (рис. 13).

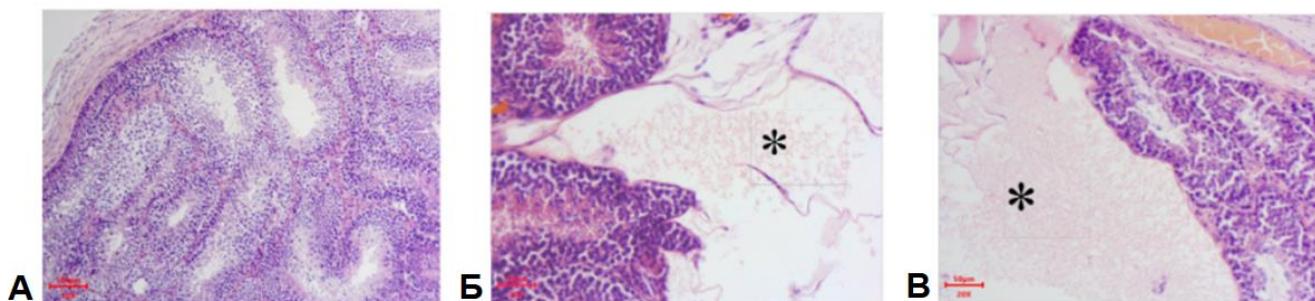


Рис. 13. Изучение влияния препарата на основе секрета МСК при локальном введении под белочную оболочку яичка самцам кроликов. Срезы органов репродуктивной системы кроликов, окраска гематоксилином и эозином. А – нормальное строение семенника кролика. Увеличение 100×. Б – место введения 1,5 ТД препарата на основе секрета 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.

10. Исследование специфических видов токсичности препарата на основе секрета МСК

Изучение иммунотоксичности на мышах

Неспецифический иммунный ответ характеризовался увеличением поглотительной активности перитонеальных макрофагов в дозах 1,5 и 2,5 ТД (рис. 14В). Данный эффект может быть обусловлен реакцией иммунной системы мышей на введение человеческих факторов и является следствием видоспецифичности. Влияния на гуморальный и клеточный иммунный ответ не обнаружено (рис. 14 А,Б).

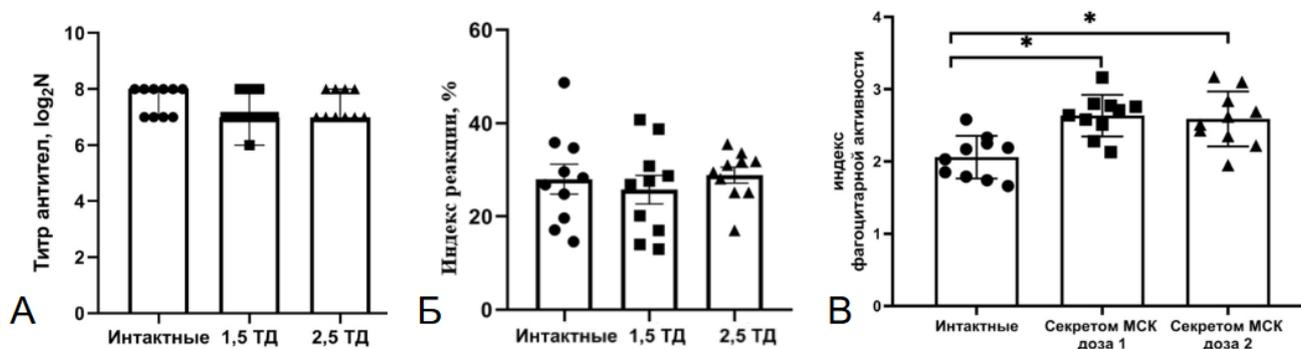


Рис. 14. Изучение влияния препарата на основе секрета МСК на иммунный ответ у мышей. А. Оценка гуморального иммунитета (данные представлены как медиана и квартильный размах). Б. Оценка клеточного иммунитета у мышей после введения препарата (данные представлены как среднее и стандартное отклонение). В. Оценка неспецифического иммунного ответа. Результаты представлены как среднее и стандартное отклонение. Количество животных в каждой группе 10. * $p < 0,05$.

Репродуктивная токсичность при локальном введении под белочную оболочку яичка

Препарат на основе секрета МСК не оказал влияния на показатели спермограммы крыс и кроликов. Изучение репродуктивной токсичности у крыс позволило установить, 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.

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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, индексируемых в базах Scopus и Web of Science

1. **Monakova A.O.** Novel potency assay for MSC secretome-based treatment of idiopathic male infertility employed Leydig cells and revealed vascular endothelial growth factor as a promising potency marker // Sagaradze G.D., Basalova N.A., Popov V.S., Balabanyan V.Yu., Efimenko A.Yu. // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23(16). – P. 9414. (IF 4,9)
2. Sagaradze G.D. Regenerative medicine for male infertility: a focus on stem cell niche injury models // **Monakova A.O.**, Basalova N.A., Popov V.S., Balabanyan V.Y., Efimenko A.Y. // Biomedical Journal. – 2022. – Vol. 45(4). – P. 607–614. (IF 4,4)
3. Sagaradze G.D. Potency Assays for Mesenchymal Stromal Cell Secretome-Based Products for Tissue Regeneration // **Monakova A.O.**, Efimenko A.Yu. // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24(11). – P. 9379. (IF 4,9)
4. **Monakova A.O.** The role of macrophages in implementing the effects of secretome of mesenchymal stromal cells in the spermatogonial stem cell niche // Basalova N.A., Balabanyan V.Yu., Kryshen K.L., Matichin A.A., Sagaradze G.D., Popov V.S., Efimenko A.Yu. // Sovremennye tehnologii v medicine. – 2025. – Т.17. – №2. – С. 37–45.

Публикации в изданиях, индексируемых в списке ВАК

5. Охоботов Д.А. Моделирование нарушений сперматогенеза химиотерапевтическими средствами – цисплатином и доксорубицином // Сагарадзе Г.Д., **Монакова А.О.**, Басалова Н.А., Балабаньян В.Ю., Попов В.С., Кирпатовский В.И., Нестерова О.Ю., Ефименко А.Ю., Камалов А.А. // Экспериментальная и клиническая урология. – 2021. – Т.14. – №4. – С. 95–101.
6. **Монакова А.О.**, Локальное введение секрета мезенхимных стромальных клеток снижает количество M2 макрофагов в моделях повреждения сперматогенеза // Сагарадзе Г.Д., Басалова Н.А., Попов В.С., Балабаньян В.Ю., Ефименко А.Ю. // Гены и Клетки. – 2022. – Т.17. – №3. – С. 154-155.
7. **Монакова А.О.** Изучение безопасности оригинального препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток при локальном введении в яички и при внутримышечном введении препарата крысам // Сагарадзе Г.Д., Балабаньян В.Ю., Басалова Н.А., Матичина А.А., Матичин А.А., Крышень К.Л., Попов В.С., Акопян Ж.А., Ефименко А.Ю. // Безопасность и риск фармакотерапии. – 2024. – Т.12. – №1. – С. 99–116.
8. **Монакова А.О.** Изучение профиля безопасности оригинального препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток при интратестикулярном введении кроликам // Балабаньян В.Ю., Вавилова В.А., Басалова Н.А., Попов В.С., Акопян Ж.А., Ефименко А.Ю. // Безопасность и риск фармакотерапии. – 2025. – Т.13. – №2. – С. 213–228.
9. **Монакова А.О.** Расширенные исследования безопасности биологического лекарственного препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток человека: иммунотоксичные и онкогенные свойства // Балабаньян В.Ю., Вавилова В.А., Крышень К.Л., Гайдай Д.С., Карагяур М.Н., Басалова Н.А., Попов В.С., Акопян Ж.А., Ефименко А.Ю. // Лабораторные животные для научных исследований. – 2025. – Т.3. – С. 56–66.

Патенты РФ

Патент РФ № 2825785. Тест-система для оценки стимуляции секреторной активности модельных клеток терапевтическими агентами, направленными на восстановление сперматогенеза. / Ткачук В.А., Акопян Ж.А., Басалова Н.А., Балабаньян В.Ю., Ефименко А.Ю., Камалов А.А., **Монакова А.О.**, Охоботов Д.А., Попов В.С., Сагарадзе Г.Д., Тарасова Е.В. // Бюл. №25 – 29.08.2024.

Монакова Анна Олеговна (Российская Федерация)

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

Настоящая диссертационная работа посвящена исследованию препарата на основе секретомы мезенхимных стромальных клеток (МСК). *In vivo* на модели токсического повреждения сперматогенеза доксорубицином показана эффективность препарата, что выразилось в увеличении общего количества сперматозоидов и доли подвижных сперматозоидов. Был показан значимый вклад фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в регенеративные эффекты секретомы МСК. Анализ биораспределения показал, что биораспределение происходит преимущественно в интерстиции, большую часть которого составляют клетки Лейдига. Мы продемонстрировали, что секретомой МСК стимулируется секреция тестостерона клетками Лейдига *in vitro*. На основании этого была разработана биологическая модель для оценки специфической активности секретомы МСК. Затем мы выявили корреляцию между степенью стимулированной продукции тестостерона и концентрацией VEGF в секретоме МСК. Однако при нейтрализации VEGF в секретоме МСК или блокировании рецептора VEGF 2 типа наблюдалась лишь тенденция к снижению эффекта секретомы МСК. Мы установили, что микроРНК-21 стимулирует клетки Лейдига и может опосредовать эффекты секретомы МСК. Препарат на основе секретомы МСК показал приемлемый профиль безопасности в исследованиях общей токсичности, фармакологической безопасности, местной переносимости, иммунотоксичности и репродуктивной токсичности.

Monakova Anna Olegovna (Russian Federation)

Efficacy and safety of a drug based on the secretome of human mesenchymal stromal cells for the treatment of spermatogenesis disorders

This dissertation is devoted to the study of a drug based on the secretome of mesenchymal stromal cells (MSCs). *In vivo*, on a model of doxorubicin-induced toxic damage to spermatogenesis, the efficacy of the drug was demonstrated, manifested by an increase in sperm count and the proportion of motile spermatozoa. Furthermore, a significant contribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) to the regenerative effects of the MSC secretome was shown. Biodistribution analysis revealed that distribution occurs primarily in the interstitium, which is largely composed of Leydig cells. We demonstrated that the MSC secretome stimulates testosterone secretion by Leydig cells *in vitro*. Based on this, a biological model for assessing the specific activity of the MSC secretome was developed. We then identified a correlation between the degree of stimulated testosterone production and the concentration of VEGF in the MSC secretome. However, neutralization of VEGF in the MSC secretome or blockade of the VEGF receptor type 2 resulted only in a trend toward a reduction of the MSC secretome's effect. We established that microRNA-21 stimulates Leydig cells and may mediate the effects of the MSC secretome. The drug based on the MSC secretome showed an acceptable safety profile in studies of general toxicity, pharmacological safety, local tolerance, immunotoxicity, and reproductive toxicity.