



(19) KG (11) 403 (13) C2 (46) 31.10.2024

(51) A01N 1/02 (2023.01)

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ И ИННОВАЦИЙ
ПРИ КАБИНЕТЕ МИНИСТРОВ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ к патенту Кыргызской Республики

(21) 20230047.1

(22) 07.07.2023

(46) 31.10.2024. Бюл. № 10

(76) Райымбеков Жаныбек Кубанычбекович
Абаралиев Акылбек Кудайназарович (KG)

(56) Абаралиев А. К., Чернецова Г. С., Райымбекова Г. Л., Садырбеков Н. Ж., Өскөн у. А. Экспериментальное моделирование коррекции андрогенной дисфункции и пролиферативной активности у мужчин с азооспермией с применением криоконсервированной суспензии клеток интерстиция и спермальных стволовых клеток. Вестник КРСУ. 2022. Том 22. № 1. Стр. 3-7

(54) Способ выделения и сохранения клеток герминогенного эпителия яичек у мужчин с азооспермией

(57) Изобретение относится к области медицины, а именно к урологии, андрологии и эмбриологии, и может быть использовано для сохранения и восстановления fertильности у мужчин с азооспермией.

Задача изобретения - обеспечение выделения оптимального и полноценного состава клеток герминогенного эпителия у мужчин с азооспермией, с максимальным сохранением пролиферативных и генеративных потенциалов, разработка режимов криоконсервации, концентрации консервантов и подбор доступных реагентов.

Поставленная задача решается способом выделения и сохранения клеток герминогенного эпителия яичек у мужчин с азооспермией путем проведения биопсии яичка, забора материала, механического и ферментативного расщепления биоптата с последующим культивированием, заморозкой материала, где в яичке иссякают белочную оболочку до 0,5 сантиметров, забор тестикулярного материала проводят в разных слоях яичка с захватом

том глубь лежащих тканей, разделение фракции клеток герминогенного эпителия осуществляют в градиенте плотности сахарозы, для этого предварительно сахарозу разбавляют с буферной средой HEPES (pH 7,4) и получают его в разных концентрациях: 25, 35 и 45 %, вносят по 2 мл каждой концентрации и насыпают последовательно на дно стерильной центрифужной пробирки объемом 15 мл, клеточную супензию насыпают на верхний слой градиента сахарозы и центрифицируют при 1200 g в течение 15 минут, далее клетки отмывают средой 199 с 20 мм HEPES (pH 7,4), а культивирование клеток осуществляют в пластиковых чашках NUNC диаметром 2,5 см в той же среде 199, что исключает потерю клеток и дополнительную экзогенную контаминацию, с добавлением 0,1 % эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллина - 100 ед/мл и канамицина - 75 мкг/мл и 20 мм HEPES (pH 7,2-7,4) при температурном режиме 37 °C в течение 7 суток, при этом проводят замену питательной среды каждые сутки, затем для дифференцированного разделения клеточных компонентов центрифицируют при 1200 g в течение 12 минут в двухслойном градиенте 80-40 % Percoll, при этом криоконсервацию проводят в криопробирках с применением криопротекторов на основе глицерина и диметилсульфоксида с 5 % конечной концентрацией и добавлением 3 % реополиглюкина и пентоксифиллина 2,5 ммоль/л, при этом производят постепенное охлаждение материала с шагом - 10 °C каждые 10 минут, при достижении - 80 °C материал погружают в жидкий азот. обеспечение выделения оптимального и полноценного состава клеток герминогенного эпителия у мужчин с азооспермией, с максимальным сохранением пролиферативных и генеративных потенциалов.

1 н. п. ф., 2 пр.

(19) KG (11) 403 (13) C2 (46) 31.10.2024

3

Изобретение относится к области медицины, а именно к урологии, андрологии и эмбриологии, и может быть использовано для сохранения и восстановления фертильности у мужчин с азооспермией.

Сохранение и восстановление фертильности у мужчин с бесплодием, обусловленное обструктивной и необструктивной формами азооспермии является актуальной проблемой в современной медицине. Так как в данное время прослеживается тенденция к увеличению мужского фактора бесплодия, а также его «омоложения». Азооспермия у мужчин характеризуется отсутствием сперматозоидов в эякуляте и является одной из тяжелых форм бесплодия. В этиологии азооспермии прослеживаются множественные причинно - следственные факторы. Лечение азооспермии у мужчин имеет важную клиническую, социально-экономическую и демографическую значимость. Выделение и сохранение суспензии клеток герминогенного эпителия яичек позволит восстановить сперматогенный и генеративный потенциал мужчин с азооспермийей.

На сегодняшний день не существует единого способа выделения и сохранения суспензии клеток герминогенного эпителия у мужчин с азооспермийей.

Известен метод выделения спермальных стволовых клеток из неонатальной аутопсийной ткани (Лю С., Тан З., Сюн Т. и соавторы. Выделение и характеристика сперматогониальных стволовых клеток человека. Репрод Биол Эндокринол 9, 141. 2011). В данном случае клетки семенников удаляли в асептических условиях в течение 30 минут. Ткани яичка помещали в культуральные чашки и удаляли придаток яичка, белочную оболочку яичка и жировую подушку. Рассеченные семенники измельчали на мелкие кусочки и дважды промывали промывочным раствором Хенкса (пенициллин 200 ЕД/мл и стрептомицин 200 мг/мл). Ткань расщепляли коллагеназой I типа в концентрации 1 г/л при 37 °C при осторожном перемешивании в течение 10 минут и затем инкубировали 10 минут. После кратковременного центрифугирования супернатант удаляли, а к оставшимся

4

осадкам добавляли 0,25 % трипсин в объеме, в 3 раза превышающем объем ткани семенника, при 37 °C в течение 10-15 мин при легком встряхивании. Реакция расщепления прекращалась, когда извитые семенные канальцы становились мягкими и рыхлыми, а большое количество клеток выходило в раствор. Диссоциированные клетки собирали центрифугированием и фильтровали через фильтрующие ловушки с размером ячеек 200 меш. Восстановленные клетки культивировали в культуральной среде DMEM/F12, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки. Жизнеспособность клеток определяли и оценивали с помощью трипанового синего. При культивировании в данном случае жизнеспособность самостоятельно культивируемых стволовых клеток сперматозоидов снижается через 24 ч, но постепенно увеличивается через 48 ч и достигает максимума через 72 ч, после чего снижается на всех остальных интервалах времени. Эти результаты могут свидетельствовать о том, что снижение количества жизнеспособных SSC через 24 часа может быть связано с такими факторами, как изменение условий окружающей среды (от *in vivo* к *in vitro*) в сочетании с воздействием ферментативного расщепления. Через 48 ч культивирования было показано, что спермальные стволовые клетки пролиферируют, возможно, в результате адаптации к среде культивирования и сывороточным факторам, необходимым для роста клеток.

В данном способе показывается выделение одного из компонентов сперматогенеза, пролиферативные признаки которых проявляются при активации факторов роста, а для формирования полноценного сперматогенеза нужен весь клеточный комплекс тестикулярного аппарата, также отмечается снижение продуктов культивирования через определенное время, тем самым есть необходимость в разработке методов сохранения выделенных клеток.

Прототипом изобретения является наша ранняя работа (Абаралиев А. К., Чернецова Г. С., Райымбекова Г. Л., Садыrbеков Н. Ж., Оскен у. А. Экспериментальное моделирование коррекции андрогенной дисфункции и

пролиферативной активности у мужчин с азооспермией с применением криоконсервированной суспензии клеток интерстиция и спермальных стволовых клеток. Вестник КРСУ. 2022. Том 22. № 1. Стр. 3-7), где для получения сперматозоидов из придатка пунктировали головку придатка с помощью шприца среднего диаметра. Полученный материал исследовали на наличие сперматозоидов. Для доступа к тестикулярной ткани, в яичке иссекена белочная оболочка размером до 0,5 см. Так как процесс сперматогенеза может проходить локально, забор тестикулярного материала проводился в разных слоях яичка. Полученную тестикулярную ткань одновременно исследовали на наличие сперматозоидов. При обнаружении сперматозоидов получали биоптат необходимого объема для дальнейшего морфологического исследования, фиксировали в стерильной пробирке со средой культивирования SpermPreparesh и отправляли в эмбриологическую лабораторию. В ходе выполнения работы использовались гистологические, иммуногистохимические, иммунноферментные методы исследования. Для протокола заморозки применялись криопробирки NUNC, объемом 1 мл. Образцы замораживали на программном замораживателе CryoLogic с использованием программы CryoGenesis 4. Разморозка материалов осуществлялась при температуре 34-37 °C, на водяной бане. При заморозке сперматозоидов использовали метод витрификации.

Смесь интерстициальных клеток яичек получали путем ферментативной обработки и далее разделяли в градиенте плотности сахараозы. В итоге была получена фракция клеток плотностью 1,127-1,176 г/см³. Далее промывали смесь клеток средой 199 при pH 7,4. Культивирование клеток интерстиция осуществляли в стерильных пластиковых чашках диаметром 2,5 см. Культивирование также проводили при температурном режиме 32-34 °C в среде 199 с добавлением 0,1 %-й эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотиков (пенициллин - 100 ед/мл и канамицин - 75 мкг/мл) и 20 мМ Непес (pH 7,2-7,4) в течение 7 суток. Через сутки осуществляли замену культуральной среды.

Изучали сохранность гормонпродуцирующих свойств (продукция тестостерона и 3β-гидроксистероиддегидрогеназная активность). Гистохимическое окрашивание проводили для выявления активности 3β-гидроксистероиддегидрогеназы с применением нитросинего тетразоля.

С применением метода суправитального окрашивания трипановым синим определяли сохранность клеток. Уровень тестостерона определяли после инкубации интерстициальных клеток в среде 199 с добавлением 20 мМ НЕPES, при 32-34 °C с использованием хорионического гонадотропина (ХГ) в концентрации 1 МЕ/мл. Содержание тестостерона измеряли иммуноферментным методом с применением наборов "РИА СТ-тестостерон" и рассчитывали на количество клеток в образцах до замораживания.

Однако, необходимо было изучить и доработать режимы криоконсервации, концентрации консервантов, и подобрать доступные по цене реагенты.

Задача изобретения - обеспечение выделения оптимального и полноценного состава клеток герминогенного эпителия у мужчин с азооспермией, с максимальным сохранением пролиферативных и генеративных потенциалов, разработка режимов криоконсервации, концентрации консервантов и подбор доступных реагентов.

Поставленная задача решается способом выделения и сохранения клеток герминогенного эпителия яичек у мужчин с азооспермией путем проведения биопсии яичка, забора материала, механического и ферментативного расщепления биоптата с последующим культивированием, заморозкой материала, где в яичке иссекают белочную оболочку до 0,5 сантиметров, забор тестикулярного материала проводят в разных слоях яичка с захватом глубь лежащих тканей, разделение фракции клеток герминогенного эпителия осуществляют в градиенте плотности сахараозы, для этого предварительно сахарозу разбавляют с буферной средой НЕPES (pH 7,4) и получают его в разных концентрациях: 25, 35 и 45 %, вносят по 2 мл каждой концентрации и насыщивают последовательно на дно стерильной

центрифужной пробирки объемом 15 мл, клеточную супензию насыпают на верхний слой градиента сахарозы и центрифугируют при 1200 g в течение 15 минут, далее клетки отмывают средой 199 с 20 mM HEPES (pH 7,4), а культивирование клеток осуществляют в пластиковых чашках NUNC диаметром 2,5 см в той же среде 199, что исключает потерю клеток и дополнительную экзогенную контаминацию, с добавлением 0,1 % эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллина - 100 ед/мл и канамицина - 75 мкг/мл и 20 mM HEPES (pH 7,2-7,4) при температурном режиме 37 °C в течение 7 суток, при этом проводят замену питательной среды каждые сутки, затем для дифференцированного разделения клеточных компонентов центрифугируют при 1200 g в течение 12 минут в двухслойном градиенте 80-40 % Percoll, при этом криоконсервацию проводят в криопробирках с применением криопротекторов на основе глицерина и диметилсульфоксида с 5 % конечной концентрацией и добавлением 3 % реополиглюкина и пентоксифиллина 2,5 ммоль/л, при этом производят постепенное охлаждение материала с шагом - 10 °C каждые 10 минут, при достижении - 80 °C материал погружают в жидкий азот.

Способ осуществляется следующим образом.

После соответствующей обработки операционного поля проведено рассечение кожного покрова по передней поверхности мошонки. Доступ к яичкам осуществляют путем послойного рассечения оболочек яичка до белочной оболочки. Проводится гемостаз сосудов. Яичко выводится в рану. Для доступа к testiculärной ткани, в яичке иссекается белочная оболочка размером до 0,5 см. Так как процесс сперматогенеза может проходить локально, забор testiculärного материала проводился в разных слоях яичка с захватом глубоко лежащих тканей. Полученную testiculärную ткань суправитально исследуем на наличие сперматозоидов. Суправитальная микроскопия обеспечивает сохранность архитектоники testiculärной ткани и обеспечивает жизнеспособность половых клеток. Микроскопия проводилась в микропланшетах

с культуральной средой. При обнаружении сперматозоидов извлекаем биоптат достаточного объема, для выделения клеток гермиогенного эпителия. После получения биоптата операционная рана ушивается узловыми швами материалом Пегасорб - 3.0. Рассеченный кожный покров обрабатывается, и накладываются узловые швы, сверху закрывается асептической повязкой. Супензию клеток интерстиция половых гонад получают после механической и ферментативной обработки ткани и разделения супензии клеток методом ступенчатого разделения в градиенте плотности с использованием сахарозы.

Для этого предварительно сахароза разбавляется с буферной средой HEPES (pH 7,4) и получаем его в разных концентрациях: 25, 35 и 45 %. Сахароза вносится по 2 мл каждой в концентрации и насыпается последовательно на дно стерильной центрифужной пробирки объемом 15 мл. Клеточную супензию насыпают на верхний слой градиента сахарозы и центрифугированием при 800 g в течение 30 минут. Клетки осаждаются на границе градиентов сахарозы в концентрации 25 и 35 %. После чего получают фракцию клеток плотностью 1,127-1,176 г/см. Для дальнейшего использования клетки отмывают средой 199 с 20 mM HEPES (pH 7,4). Культивирование клеток осуществляли в пластиковых чашках NUNC диаметром 2,5 см в той же среде 199, что исключает потерю клеток и дополнительную экзогенную контаминацию, с добавлением 0,1 % эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотиков (пенициллин - 100 ед/мл и канамицин - 75 мкг/мл) и 20 mM HEPES (pH 7,2-7,4) при температурном режиме 32-34 °C в течение 7 суток. Замену питательной среды проводят каждые сутки. Для гистохимического окрашивания на выявление активности 3β-гидроксистероиддегидрогеназы (3βГСД), 2-4×106 клеток инкубируются в 2,5 мл забуференного физиологического раствора (pH 7,4) и содержащего 0,2 мг/мл нитросинегетразолия, 1 мг/мл НАД и 0,12 мг/мл дегидроэпиандростерона в течение 90 минут при 32-34 °C. Сохранность клеток контролируют методом суправитального окрашивания трипановым синим. Базальную и стимулирован-

ную секрецию тестостерона исследуют путем инкубации в среде 199 с 20 мМ НЕРЕС в течение часа при 32-34 °C. Как стимулятор стероидогенеза используют хорионический гонадотропин (ХГ) в концентрации 1 МЕ/мл от конечного объема. Криоконсервацию проводят в криобирках с применением криопротекторов на основе глицерина и диметилсульфооксида с 5 % конечной концентрацией и добавлением реополиглюкина, 3 % к объему замораживаемого материала. Необходимо постепенное охлаждение материала с шагом -10 °C каждые 10 минут. При достижении -80 °C материал погружается в жидкий азот в течение 15 минут. Хранение клеток герминогенного эпителия проводится в сосудах Дьюара с жидким азотом -196 °C. Разморозка суспензии клеток проводится на водяной бане при температуре +34-37 °C.

Пример № 1. Больной Ч. М. И., 14.11.1988 г.р. История болезни № 29348/750. Госпитализирован с диагнозом - Бесплодие, отсутствие эрекции и асперматизм. Нарушение функций тазовых органов. Нейрогенный мочевой пузырь. Эпистостомия. Нижняя параплегия. Жалобы на отсутствие детей в течение 10 лет, нарушение двигательной функции вследствие перенесенной травмы и операции на позвоночник. Нарушение функций тазовых органов.

Проведена пункция придатка и биопсия яичка. После суправитального исследования и обнаружения сперматозоидов были взяты множественные биоптаты с глубь лежащих

тканей тестисов для выделения сперматозоидов и клеток герминогенного эпителия. Выписан в удовлетворительном состоянии, сперматозоиды и клетки герминогенного эпителия успешно криоконсервированы.

Пример № 2. Больной Н. уулу М. 1994 г.р., история болезни № 9657. Госпитализирован в отделение урологии № 4 с диагнозом - Бесплодие. Азооспермия. Киста головки придатка левого яичка.

Из анамнеза - отсутствие детей в течение 5 лет. При проведении обследования спермограммы обнаружена азооспермия, пролактин повышен 823 мМЕ/л, ФСГ - 29 МЕ/л, ЛГ - 12,3 МЕ/л, значение тестостерона в пределах нормы - 20,1 нмоль/л. Данные ультразвукового исследования выявили кисту головки придатка левого яичка. Размеры яичек в норме и составляют в среднем 33x17 мм. Проведена пункционная аспирация сперматозоидов из придатка и биопсия яичка, произведен сбор сперматозоидов и клеток герминогенного эпителия, успешно криоконсервированы. После проведения процедуры вспомогательных репродуктивных технологий супруга забеременела. Родоразрешение произведено путем проведения кесарева сечения, плод доношенный. Ребенок мужского пола. На данный момент ребенку 4 года.

У 40 больных мужчин с азооспермией успешно проведена биопсия яичка, выделены клетки герминогенного эпителия успешно криоконсервированы.

11

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ выделения и сохранения клеток герминогенного эпителия яичек у мужчин с азооспермией путем проведения биопсии яичка, забора материала, механического и ферментативного расщепления биоптата с последующим культивированием, заморозкой материала, где в яичке иссекают белочную оболочку до 0,5 сантиметров, забор тестикулярного материала проводят в разных слоях яичка с захватом глубылежащих тканей, разделение фракции клеток герминогенного эпителия осуществляют в градиенте плотности сахарозы, для этого предварительно сахарозу разбавляют с буферной средой HEPES (рН 7,4) и получают его в разных концентрациях: 25, 35 и 45 %, вносят по 2 мл каждой концентрации и насыпаивают последовательно на дно стерильной центрифужной пробирки объемом 15 мл, клеточную суспензию насыпаивают на верхний слой градиента сахарозы и центрифигируют при 1200 g в течение 15 минут, далее клетки отмывают средой 199 с 20 мм HEPES (рН 7,4), а культивирование клеток

12

осуществляют в пластиковых чашках NUNC диаметром 2,5 см в той же среде 199, что исключает потерю клеток и дополнительную экзогенную контаминацию, с добавлением 0,1 % эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллина - 100 ед/мл и канамицина - 75 мкг/мл и 20 мм HEPES (рН 7,2-7,4) при температурном режиме 37 °C в течение 7 суток, при этом проводят замену питательной среды каждые сутки, затем для дифференцированного разделения клеточных компонентов центрифигируют при 1200 g в течение 12 минут в двухслойном градиенте 80-40 % Percoll, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что криоконсервацию проводят в криопробирках с применением криопротекторов на основе глицерина и диметилсульфоксида с 5 % конечной концентрацией и добавлением 3 % реополиглюкина и пентоксифиллина 2,5 ммоль/л, при этом производят постепенное охлаждение материала с шагом - 10 °C каждые 10 минут, при достижении - 80 °C материал погружают в жидккий азот.

Выпущено отделом подготовки официальных изданий