

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-134-142

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ СПЕРМАТОГОНИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ЛЕЧЕНИИ МУЖСКОЙ ИНФЕРТИЛЬНОСТИ

Н.Н. Скалецкий, Г.Н. Скалецкая, В.И. Севастьянов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Сперматогониальные стволовые клетки, которые существуют в семенниках с рождения, являются клетками-предшественниками мужских гамет. Эти клетки не способны продуцировать зрелые сперматозоиды до половой зрелости из-за их зависимости от гормональных стимулов. Эта особенность репродуктивной системы позволяет сохранять фертильность только мужчинам, которые способны производить эякулят. Поэтому при угрозе потери фертильности вследствие применения противоракового лечения стандартным является криоконсервация спермы. Этой возможности лишены неполовозрелые мальчики с онкологическими заболеваниями, которым назначают токсическую для их репродуктивной системы химиотерапию. В настоящем обзоре основное внимание уделяется проблеме получения и сохранения сперматогониальных стволовых клеток для будущей трансплантации с целью восстановления сперматогенеза. Разработка этих методов становится все более актуальной в связи с ростом за последние десятилетия выживаемости детей с онкологическими заболеваниями благодаря улучшению диагностики и эффективности лечения. Восстановление и сохранение фертильности с помощью сперматогониальных стволовых клеток может быть у таких пациентов безальтернативным вариантом.

Ключевые слова: сперматогониальные стволовые клетки, фертильность, культивирование клеток.

PROSPECTS FOR APPLICATION OF SPERMATOGONIAL STEM CELLS IN THE TREATMENT OF MALE INFERTILITY

N.N. Skaletsky, G.N. Skaletskaya, V.I. Sevastianov

V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Spermatogonial stem cells, which exist in the testicles since birth, are progenitors cells of male gametes. These cells are not able to produce mature sperm cells before puberty due to their dependency of hormonal stimuli. This peculiarity of the reproductive system limits the preservation of fertility only to males who are able to produce an ejaculate. Therefore, in case of threat of loss of fertility due to the use of anticancer treatment, cryopreservation of sperm is standard. This possibility is denied to deficient boys with cancer, who are prescribed toxic chemotherapy for their reproductive system. This review focuses on the problem of producing and preserving spermatogonial stem cells for the purpose of future transplantation to restore spermatogenesis. The development of these methods is becoming increasingly relevant due to the increase in the survival rate of children with cancer over the past decades due to improved diagnosis and effectiveness of treatment. The restoration and preservation of fertility through the use of spermatogonial stem cells may be an unopposed option in such patients.

Key words: spermatogonial stem cells, fertility, cell culture.

ВВЕДЕНИЕ

Лечение мужского бесплодия является актуальной проблемой, решение которой имеет не только медицинское и психосоциальное значение, но и в

определенной мере способно повлиять на будущее той или иной нации. Правильное понимание патологических процессов, лежащих в основе нарушений фертильности, крайне важно, так как к нарушению

Для корреспонденции: Скалецкий Николай Николаевич. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел.: (499) 190-42-66, (903) 790-95-39. E-mail: NSkaletsky@mail.ru

For correspondence: Skaletskiy Nikolay Nikolaevich. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel.: (499) 190-42-66, (903) 790-95-39. E-mail: NSkaletsky@mail.ru

количественных и качественных параметров спермы приводят различные этиологические факторы и патогенетические механизмы. Согласно статистическим оценкам, более 8% мужчин репродуктивного возраста обращаются за медицинской помощью по поводу бесплодия. Среди половины субфертильных (со сниженной плодовитостью) пар мужской фактор является основной причиной, и примерно у 12% субфертильных мужчин выявляются тяжелые формы олигозооспермии или азооспермии. При олигозооспермии сперматозоиды в сперме мужчины содержатся в меньшем количестве, чем это необходимо для нормального оплодотворения. К снижению количества сперматозоидов в эякуляте могут привести генетические нарушения, воспалительные, эндокринные и инфекционные заболевания, злоупотребление алкоголем и наркотиками, радиация или прием некоторых препаратов с гонадотоксическим побочным эффектом, отравление тяжелыми металлами и углекислым газом. Азооспермия – это отсутствие сперматозоидов в эякуляте. Встречаются два типа данной патологии: обструктивная и необструктивная. При обструктивной азооспермии сперматозоиды не могут попасть в семенную жидкость из-за нарушения проходимости или отсутствия семявыводящих протоков. Поражаться могут также протоки, находящиеся в придатках яичка. К обструкции протоков иногда приводят различные инфекционные и воспалительные заболевания, травмы, варикоцеле или врожденные аномалии строения мочеполовой системы. Необструктивная азооспермия возникает в результате эндокринных и генетических заболеваний, после радиационного облучения, при некоторых нарушениях обмена веществ (сахарный диабет), онкологических заболеваниях. В лечении большинства случаев азооспермии, особенно ее необструктивных форм, генетически обусловленных, могут быть использованы в качестве приоритетных вспомогательные репродуктивные технологии, ставящие своей целью восстановление качественных и количественных параметров спермы или обеспечение процесса созревания сперматозоидов в условиях *ex vivo*. В связи с этим возможность получения зрелых сперматозоидов в необходимом количестве путем манипуляций *in vitro* дает надежду мужчинам с тяжелыми нарушениями сперматогенеза достичь биологического отцовства.

Сперматогониальные стволовые клетки (ССК), которые уже присутствуют при рождении, являются стволовыми клетками семенника [1, 2]. Эти клетки не способны продуцировать зрелые сперматозоиды до половой зрелости, которая наступает на фоне соответствующих гормональных стимулов. Эта биологическая характеристика репродуктивной системы обеспечивает сохранение фертильности только у мужчин, которые способны производить эякулят, потому что стандартной процедурой, как правило,

гарантирующей в будущем реализацию отцовства, является криоконсервация спермы [3–5]. Это возможность становится крайне актуальной у мужчин, подвергшихся токсическому воздействию на их репродуктивную систему химиотерапии и облучения, проводимых по поводу рака, и приводящих к бесплодию [2, 6].

За последние десятилетия показатели выживаемости при онкологических заболеваниях у детей выросли благодаря улучшению диагностики и более эффективному лечению [4]. При этом противораковая терапия зачастую оказывает губительное действие на репродуктивную систему неполовозрелых мальчиков, у которых проведение предварительного консервирования спермы невозможно ввиду ее отсутствия. В настоящее время разрабатываемым вариантом восстановления сперматогенеза после проведения химиотерапии у мальчиков до половой зрелости является криоконсервация ткани семенника для будущего извлечения ССК и их трансплантации. Надежду на успех в этом направлении дают факты восстановления сперматогенеза у животных после трансплантации им ССК [7–11]. Разработка технологии аутологичной трансплантации ССК, способных дифференцироваться в зрелые сперматозоиды, будет иметь большое значение для практической медицины [12]. В результате успешного проведения необходимых исследований по получению, хранению и трансплантации ССК возможность обладать фертильностью станет доступной для неполовозрелых мальчиков с онкологическими заболеваниями [3]. Ниже описываются основы получения (выделения), идентификации и культивирования ССК *in vitro* с целью их пролиферации. Оцениваются перспективы использования ССК для обеспечения фертильности у мальчиков в препубертате.

ВЫДЕЛЕНИЕ СПЕРМАТОГОНИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Как правило, исследования по выделению клеток основываются на их способности к самообновлению [13, 14] и оптимизации процедур, повышающих чистоту получаемых ССК, прежде всего путем недопущения их контаминации другими типами клеток. Как правило, ССК выделяют с помощью ферментативного переваривания, которое обычно включает комбинацию ферментов, таких как коллагеназа, трипсин и ДНКаза [15]. Для получения наиболее чистой популяции ССК были разработаны различные методы, такие как морфологический отбор, связанный с дифференциальным осаждением, отбор внеклеточного матрикса, флюоресцентно-активированная сортировка клеток (FACS) и магнитно-активированная сортировка клеток (MACS).

Селекция ССК с помощью морфологического метода является самой простой и недорогой, однако она имеет самую низкую эффективность [16]. Поскольку этот метод основан на ферментативном выделении клеток с последующим их осаждением в разное время, получающиеся образцы оказываются контаминированными различными типами тестикулярных клеток, такими как клетки Сертоли, клетки Лейдига, миоидные клетки, а также фибробластами [16, 17]. Эти клетки в определенной мере могут выделять факторы роста, гормоны и элементы внеклеточного матрикса и таким образом вмешиваться в самообновление и пролиферацию ССК *in vitro* [17]. Селекция на основе внеклеточного матрикса использует различные внеклеточные белки, такие как ламинин и фибронектин, чтобы стимулировать адгезию ССК. Эти субстраты способны связывать другие компоненты внеклеточного матрикса, и они широко используются в культуре клеток *in vitro* для содействия прикреплению клеток и стимуляции их пролиферации [18]. Поскольку ССК имеют слабый потенциал адгезии, необходимо способствовать их прикреплению путем покрытия субстратами для поддержания их жизнеспособности *in vitro* [18]. Популяция ССК высокой чистоты может быть получена с использованием сортировочных анализов, таких как FACS и MACS. Хотя описанные методы в принципе могут обеспечить клеточную популяцию высокой чистоты, они имеют недостатки из-за ресурсоемкости процедур и технических сложностей, которые нередко приводят к низкой продукции и недостаточной жизнеспособности клеток [15, 18].

Для получения высокочистых клеточных суспензий целесообразно использовать комбинацию различных способов выделения ССК и искать новые методические подходы. Как показал анализ применяемых протоколов, большинство из них предусматривает дифференциальное высевание исходной клеточной суспензии для устранения других типов тестикулярных клеток. Этот метод разделяет клетки в соответствии с их отличительными особенностями прикреплению. Клетки высевают непосредственно в чашки для культуры тканей или чашки с матричным покрытием с использованием желатина, ламинина, фибронектина или коллагена [16, 17]. Недавнее исследование показало эффективное удаление контаминированных клеток и высокой чистоты отбор ССК с использованием двухстадийной очистки. Сначала собранные ССК культивировали на соматических клетках и клетках Сертоли, а после отделения клетки очищали центрифугированием в градиенте плотности бычьего сывороточного альбумина. Этот способ позволил удалить большую часть ненужных клеток, и чистота клеточной суспензии ССК достигла более 91,5% [18].

Учитывая, что основной целью выделения, культивирования и трансплантации ССК является сохранение и восстановление фертильности, а также то, что большинство пациентов, которые получают пользу от трансплантации ССК, в момент биопсии яичек больны раком, необходимо устранить риск повторного введения злокачественных клеток. Достижение высокой чистоты популяций ССК путем определенного сочетания выявленных положительных и отрицательных маркеров отбора следует признать необходимым для исключения злокачественной контаминации (1). Несмотря на это, пока не удалось с достаточной уверенностью идентифицировать комбинацию положительных и отрицательных маркеров для получения чистой суспензии ССК [19]. Однако недавнее исследование показало, что при сочетании CD90 (положительный маркер) и CD45 (отрицательный маркер) суспензия зародышевых клеток оказалась свободной от раковых клеток [12].

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СПЕРМАТОГОНИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

Как и в случае стволовых клеток во многих тканях, доля ССК по сравнению с окружающими соматическими клетками существенно ниже. У мышей ССК, находящиеся в эпителии семенных канальцев, составляют лишь около 0,03% всех клеток семенника [12, 20]. Чтобы получить достаточное для будущей ауто трансплантации количество ССК, нужно искусственно увеличить их массу с учетом того, что объем семенника взрослого мужчины приблизительно в 60 раз больше, чем величина биоптата, взятого у неполовозрелого мальчика. В таблице приведены этапные работы по получению ССК и их трансплантации.

Успешная долгосрочная пролиферация ССК *in vitro* была впервые продемонстрирована у мышей и крыс [21–27]. Показано, что при культивировании количество ССК грызунов может экспоненциально увеличиваться, и они способны сохранять свой биологический потенциал для продуктивного сперматогенеза и восстановления фертильности после пересадки в семенники бесплодных мышей-реципиентов [9, 10, 24–28]. Затем было сообщено о сохранении ССК нечеловеческих приматов путем кратковременного культивирования [29], а несколько групп сообщили как о кратковременном, так и продолжительном культивировании ССК человека, причем как у взрослых мужчин, так и у мальчиков до наступления у них половой зрелости [30–36]. В одном из исследований [30] при культивировании клеток семенников человека в течение 64 дней количество ССК увеличилось более чем в 18 000 раз.

Культуральная система, разработанная для ССК, обычно основана на использовании питательной среды, дополненной гормонами и факторами рос-

Таблица

Основные достижения в разработке получения ССК *in vitro* с целью их применения для восстановления фертильности

Major advances in the development of *in vitro* SSC production for fertility recovery applications

Год	Авторы	Наиболее значимые исследования	Вид
1971	Huckins	Модель обновления и дифференциации сперматогонии и выявление сперматогониальных стволовых клеток (ССК)	Крыса
1994	Brinster and Avarbock	Первая успешная трансплантация тестикулярных клеток от одной мыши к другой, появление потомства от донора	Мышь
1998	Nagano et al.	Поддержание <i>in vitro</i> ССК в течение 4 месяцев с использованием фидерного слоя из соматических клеток	Мышь
1999	Schlatt et al.	Ксенотрансплантация суспензии тестикулярных клеток, полученных от одного примата, в семенники другого	Обезьяна
2002	Nagano et al.	Первое сообщение об успешной колонизации клеток в мышинных семенниках после ксенотрансплантации человеческих ССК	Человек
2003	Kanatsu-Shinohara et al.	Пролонгированное размножение SSC <i>in vitro</i> с использованием GDNF без иммортализации клеток в культуре	Мышь
2005	Keros et al.	Доказательство успешной криоконсервации биоптатов семенников без снижения их структурной целостности	Человек
2005	Kanatsu-Shinohara et al.	Длительное размножение ССК в среде без сыворотки и фидерного слоя	Мышь
2009	Sadri-Ardekani et al.	Долгосрочное размножение <i>in vitro</i> ССК, полученных из семенников взрослых, с сохранением функциональных возможностей	Человек
2011	Sadri-Ardekani et al.	Долгосрочное размножение ССК, полученных из половозрелых семенников, с сохранением их функции	Человек
2012	Hermann et al.	Продуцирование половозрелыми макаками, подвергнутыми аутогенной трансплантации ССК, функционально-активной спермы, способной оплодотворять ооциты	Обезьяна
2014	Langenstroth et al.	Разделение соматических и зародышевых клеток для создания культур ССК	Обезьяна
2018	Sharma et al.	Дифференцировка ксенотрансплантированных ССК мартышек в зависимости от пола и фертильности мышей-реципиентов	Обезьяна

та, а также на применении фидерного (питающего) слоя соматических клеток [35]. Ключевым фактором для большинства клеточных культур является эмбриональная сыворотка животных, но она оказалась неблагоприятной для пролиферации ССК [25]. Использовались различные концентрации сыворотки в ростовой среде при культивировании ССК, но ни одна из них не была способна усилить их пролиферацию по сравнению со средой без сыворотки [25]. Для восполнения нехватки гормонов или факторов роста, обеспечиваемых сывороткой, требуется использование очищенных белков и добавок [37]. Некоторые из выявленных факторов роста, необходимых для пролиферации ССК, представляют собой нейротрофический фактор, полученный из линии глиальных клеток (GDNF), и фактор роста фибробластов 2 [14, 26, 38].

Увеличение количества ССК в системе культуры *in vitro* в идеале должно максимально напоминать ситуацию *in vivo* [39]. В условиях *in vivo* существует сложная нишевая среда, где ССК и соматические поддерживающие клетки взаимодействуют для установления необходимой внутриклеточной сигнализации. Был выявлен ряд факторов, которые требуются для

поддержания стволовых клеток. Создание искусственной имитации нишевой среды является весьма непростой задачей, потому что существует множество факторов, которые организуют взаимодействие между ССК и соматическими клетками, и большинство из них недостаточно охарактеризованы. Использование фидерного (питательного) слоя, состоящего из соматических клеток (часто это инактивированные мышинные эмбриональные фибробласты, МЭФ) считается важным для успешного размножения ССК [8, 40]. Рост сперматогоний на фидерном слое может привести к образованию трехмерных агрегатов, называемых кластерами, которые содержат множество типов клеток, включая ССК [41]. С целью увеличения их количества необходимо обеспечить *in vitro* микроокружение, максимально близкое нише ССК в семенниках [13, 39]. Ниша ССК состоит из различных опорных клеток, таких как клетки Сертоли, перитубулярные, миоидные и Лейдига [18]. Однако ферментативная обработка с целью диссоциации ткани и выделения клеток разрушает целостность столь важного микроокружения. Использование фидерного слоя оказывает положительное влияние на поддержание ССК, поскольку содержащиеся в нем клетки

продуцируют факторы роста и цитокины, которые способствуют кондиционированию среды [8, 42–44]. Аналогичным образом фидерный слой (МЭФ) обеспечивает удобную поверхность для присоединения ССК. Как и любой другой тип клеток, они непосредственно зависят от топографии, шероховатости и жесткости субстратов [45, 46]. Применение ряда приемов, улучшающих условия культивирования ССК, позволило обеспечить длительное увеличение пула клеток, полученных из различных штаммов мышей разных возрастных групп. ССК сохраняли недифференцированность в течение 6 месяцев без потери функции и способности к восстановлению нормального сперматогенеза после трансплантации [26]. Однако клиническое применение ССК требует разработки систем культивирования без ксеногенных и фидерных культуральных систем, чтобы избежать патогенной контаминации [47].

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕРМАТОГОНИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В БУДУЩЕМ

С конца 1990-х годов стало возможным восстановление сперматогенеза в моделях на животных. С тех пор достигнут большой прогресс в изучении характерных особенностей сперматогонимальных стволовых клеток, возможности поддержания их *in vitro* путем разработки культуральных систем [42, 47, 48].

Для будущего клинического применения человеку культуральная среда предпочтительно не должна содержать сыворотки, полученной от животных из-за возникновения возможных зоонозных или ксенотоксических эффектов. Применение соматических клеток, присутствующих в биоптатах семенников, способствует поддержанию ССК и может позволить обходиться без использования экзогенных клеток, находящихся в фидерном слое. С другой стороны, можно представить, что культивирование в среде, в которой отсутствует сыворотка [49] или некоторые факторы роста [40], может повлиять на функцию ССК и привести к уменьшению их потенциала [44]. Вмешательство в культуральные условия представляет собой «обоюдоострый меч»: с одной стороны, происходит увеличение количества ССК за счет добавления определенных факторов, с другой – возможны нарушения их функциональности из-за этих же добавок. Способность модулировать условия *in vitro*, участвующие в контроле самообновления, в противоположность дифференцировке сперматогонимальных стволовых клеток, может привести к продукции функционально-активных гамет *in vitro* [42]. Эта продукция, связанная с методами трансплантации моделей, разработанных на животных, людям, позволит изучать молекулярную и клеточную биологию дифференцировки мужских

зародышевых клеток и даст возможность разрабатывать новые терапевтические стратегии в отношении бесплодия [16, 42].

Возможность восстановления фертильности у мужчин имеет большой потенциал в фундаментальной и прикладной науке [15, 50]. Развитие культуральных методов может дать будущую надежду на сохранение фертильности в случаях без других вариантов, например, у препубертатных пациентов, больных раком. Многие клиники уже криоконсервируют ткань яичек от больных раком мужчин. Однако следует разработать методы для устранения риска повторного введения злокачественных клеток во время трансплантации ССК [2].

Кроме того, различные исследования показали, что ССК способны дифференцироваться в различные типы клеток *in vitro*, такие как кардиомиоциты и нервные клетки. Важно отметить, что эти клетки имеют несколько преимуществ по сравнению с эмбриональными стволовыми клетками, включая отсутствие этических опасений относительно их использования и происхождения, и имеют более низкую частоту туморогенеза и иммунного отторжения. Основываясь на этих предположениях, сперматогонимальные стволовые клетки могут быть одним из наиболее перспективных кандидатов для клинических применений в области клеточной терапии [23].

Как уже было указано выше, размер биоптата, который может быть получен из семенников мальчиков в препубертате, относительно мал и может содержать небольшое количество ССК. Количество ССК, которое потребуется для регенерации сперматогенеза и достижения фертильности у человека, пока еще точно не известно, но разумно предположить, что количество ССК должно быть существенно увеличено в культуре перед трансплантацией для обеспечения надежного приживания и результативного сперматогенеза. Каждая группа исследователей, сообщающая о культуре ССК человека, использовала различные методы для выделения клеток и их культивирования, различные питательные среды и матричные субстраты [51, 52], различные наборы факторов роста и различные методы оценки полученных результатов. До недавнего времени ни один метод получения культур человеческих ССК не был независимо тиражирован другой исследовательской группой, и это должно произойти для подтверждения истинного успеха и достижения реального прогресса [19]. Кроме того, в то время как трансплантация ССК с целью регенерации сперматогенеза с использованием функционально-активных сперматозоидов и получения потомства является «золотым стандартом» оценки качества полученных ССК грызунов, не существует эквивалентного анализа ССК человека. Молекулярные маркеры и ксенотрансплантация между людьми и мышами могут быть разумными

суррогатными анализами, но пока нет согласования с научным сообществом, которое бы позволило проводить эксперименты с ССК человека. Возможно, осуществление морфогенеза яичек *de novo* и/или использование децеллюляризованных семенников помогут создать полноценную модель сперматогенеза человека и провести необходимые эксперименты.

В определенной степени обобщая описанные в настоящем обзоре многочисленные исследования, посвященные изучению профилактики и лечения мужской инфертильности, можно показать их в виде небольшой схемы (рис.) и комментария к ней, которые представлены ниже [25].

А. Сперматозоиды, полученные из эякулированной спермы или путем экстракции сперматозоидов (TESE) из семенников инфертильных мужчин, могут быть использованы для достижения беременности путем внутриматочного оплодотворения (IUI), оплодотворения *in vitro* (ЭКО) или ЭКО с интрацитоплазматической инъекцией спермы (ICSI).

В. При невозможности получения сперматозоидов путем биопсии может быть получена ткань яичка, содержащая сперматогониальные стволовые клетки (SSC). Ткань яичка можно переваривать ферментами для получения клеточной суспензии, из которой благодаря культивированию может быть получено значительное количество ССК, которые, в свою очередь, могут быть трансплантированы в семенники пациента. Этот способ способен регенерировать сперматогенез, и возможно, естественную фертильность. Гетерогенные суспензии тестикулярных клеток также обладают потенциалом для морфогенеза яичек *de novo* с семенными канальцами и поляризованным эпителием, окруженным базальной мембраной с зародышевыми клетками внутри и интерстициальными клетками снаружи канальцев. Сперма, генерируемая в «перестроенных» семенниках, может быть использована для оплодотворения яйцеклеток путем ICSI. Интактные ткани семенников от препубертатных животных могут быть ауто- или ксенотранспланти-

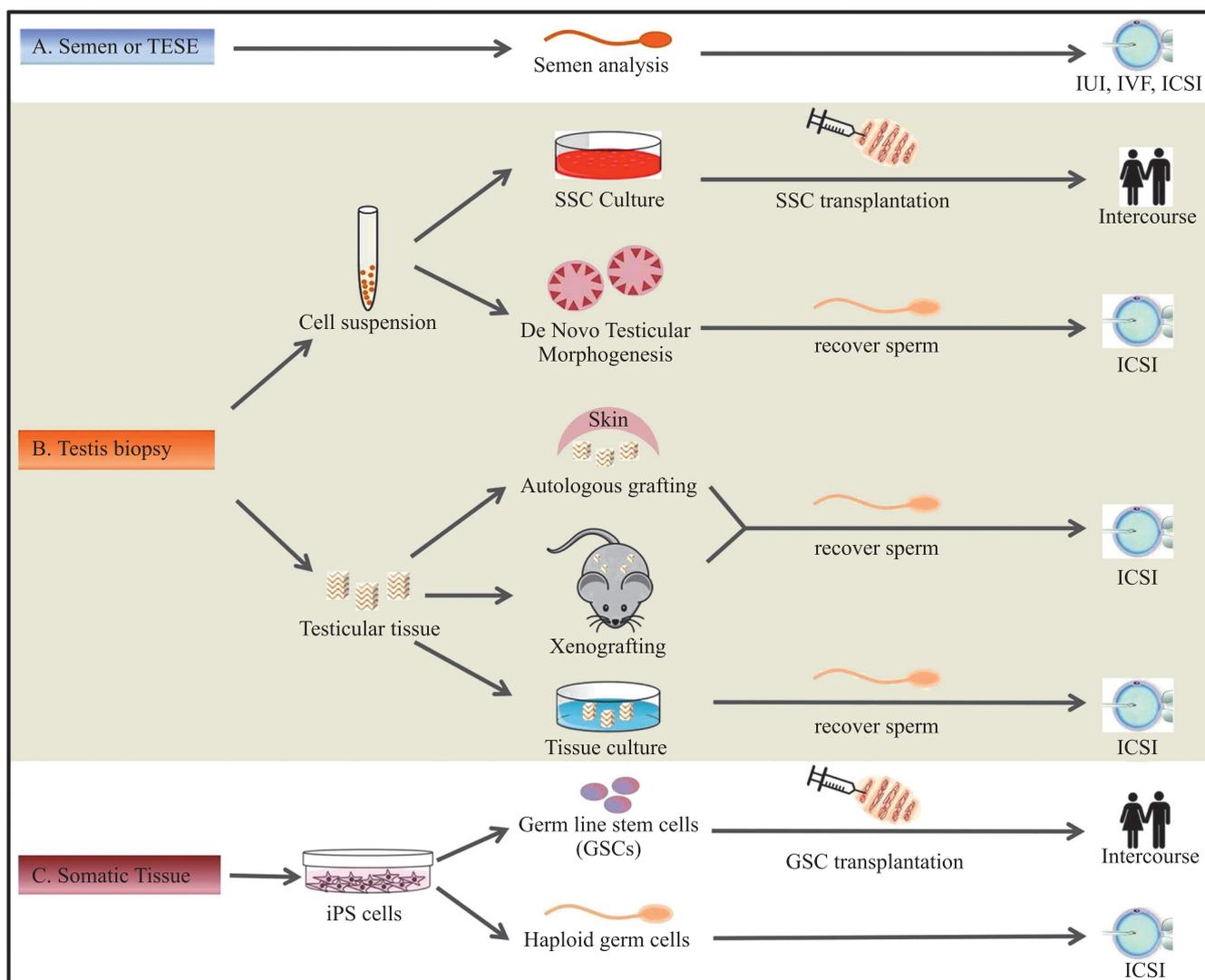


Рис. Стандартные и экспериментальные варианты лечения мужского бесплодия (по K. Gassei, K.E. Orwig, 2015)

Fig. Standard and experimental treatment options for male infertility (by K. Gassei, K.E. Orwig, 2015)

рованы под кожу или в мошонку и продуцировать зрелую сперму, которая может быть использована для оплодотворения яйцеклеток с помощью ICSI. Сперма может также генерироваться, когда незрелые ткани яичка сохраняются в культуре и используются для оплодотворения яйцеклеток с помощью ICSI.

С. Специфичные для пациента индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS) могут быть получены из соматических тканей пациента (например, кожи или крови) и дифференцированы в зародышевые стволовые клетки (GSC) для дальнейшего их введения в семенники пациента. Этот способ может иметь потенциал для регенерации сперматогенеза и естественной фертильности. Также возможно дифференцировать клетки iPS в сперматозоиды, которые можно использовать для оплодотворения яйцеклеток путем ICSI.

По-видимому, существенную роль в инициации и поддержке научных исследований, посвященных профилактике и лечению мужской инфертильности, может сыграть помощь со стороны социальных сил. Общество начинает осознать пользу от сохранения фертильности у детей и подростков, страдающих от онкологических заболеваний и подвергающихся гонадотоксической химиотерапии, а также имеющих серьезные нарушения сексуального развития [53]. Предпринимаются определенные усилия по созданию многопрофильных общественных групп для оказания помощи в разработке исследований по сохранению фертильности у детей, оценке соответствующих этических вопросов и необходимых материальных затрат. В частности, создан консорциум «Онкофертильность», целью которого является оказание помощи медицинским работникам в разработке соответствующих программ в учреждениях, не имеющих службы, занимающейся вопросами сохранения фертильности у детей [54].

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Hermann BP, Sukhwani M, Salati J, Sheng Y, Chu T, Orwig KE. Separating spermatogonia from cancer cells in contaminated prepubertal primate testis cell suspensions. *Hum Reprod.* 2011; 26 (12): 3222–3231.
- Struijk RB, Mulder CL, Veen van der F, Pelt van AM, Repping S. Restoring fertility in sterile childhood cancer survivors by autotransplanting spermatogonial stem cells: are we there yet? *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 903142. Published online 2013 Jan 3. doi: 10.1155/2013/903142.
- Berg van den H, Repping S, Veen van der F. Parental desire and acceptability of spermatogonial stem cell cryopreservation in boys with cancer. *Hum Reprod.* 2007; 22 (2): 594–597.
- Ginsberg JP. Educational paper: the effect of cancer therapy on fertility, the assessment of fertility and fertility preservation options for pediatric patients. *Eur J Pediatr.* 2011; 170 (6): 703–708.
- Linkeviciute A, Boniolo G, Chiavari L, Peccatori FA. Fertility preservation in cancer patients: the global framework. *Cancer Treat Rev.* 2014; 40 (8): 1019–1027.
- Green DM, Kawashima T, Stovall M, Leisenring W, Sklar CA, Mertens AC et al. Fertility of male survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol.* 2010; 28 (2): 332–339.
- Ogawa T, Aréchaga JM, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol.* 1997; 41 (1): 111–122.
- Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell.* 1998; 30 (4): 389–397.
- Камалов АА, Сухих ГТ, Курпатовский ВИ, Зарайский ЕИ, Полтавцева ПА, Плотников ЕЮ и др. Особенности регенерации тестикулярной ткани и восстановление фертильности у крыс на фоне ксенотрансплантации обогащенных стволовых и прогениторных клеточных культур при двустороннем абдоминальном крипторхизме. *Урология.* 2008; 6: 4–7. Kamalov AA, Sukhikh GT, Kirpatovskiy VI, Zarayskiy EI, Poltavtseva PA, Plotnikov EYu i dr. Osobennosti regeneratsii testikulyarnoy tkani i vosstanovlenie fertil'nosti u krys na fone ksenotransplantatsii obogashchennykh stvolovykh i progenitornykh kletochnykh kul'tur pri dvustoronnem abdominal'nom kriptorkhizme. *Urologiya.* 2008; 6: 4–7.
- Камалов АА, Сухих ГТ, Курпатовский ВИ, Зарайский ЕИ, Полтавцева ПА, Плотников ЕЮ и др. Особенности регенерации тестикулярной ткани и восстановление фертильности у крыс на фоне ксенотрансплантации обогащенных фетальных клеточных культур при двустороннем абдоминальном крипторхизме. *Урология.* 2008; 6: 7–11. Kamalov AA, Sukhikh GT, Kirpatovskiy VI, Zarayskiy EI, Poltavtseva PA, Plotnikov EYu i dr. Osobennosti regeneratsii testikulyarnoy tkani i vosstanovlenie fertil'nosti u krys na fone ksenotransplantatsii obogashchennykh fetal'nykh kletochnykh kul'tur pri dvustoronnem abdominal'nom kriptorkhizme. *Urologiya.* 2008; 6: 7–11.
- Курпатовский ВИ, Кудрявцев ГЮ, Кудрявцева ЛВ, Фролова ЕВ. Восстановление нарушенного сперматогенеза после интратестикулярной трансплантации ткани неонатального яичка. *Экспериментальная и клиническая урология.* 2018; 4: 15–21. Kirpatovskiy VI, Kudryavtsev GYu, Kudryavtseva LV, Frolova EV. Vosstanovlenie narushennogo spermatogeneza posle intratestikulyarnoy transplantatsii tkani neonatal'nogo yaichka. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya urologiya.* 2018; 4: 15–21.
- Smith JF, Yango P, Altman E, Choudhry S, Poelzl A, Zama AM et al. Testicular niche required for human spermatogonial stem cell expansion. *Stem Cells Transl Med.* 2014; 3 (9): 1043–1054.
- Bellvé AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. Spermatogenic cells of the prepuber-

- tal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol.* 1977; 74 (1): 68–85.
14. Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91 (24): 11303–11307.
 15. Aponte PM. Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. *World J Stem Cells.* 2015; 7 (4): 669–680.
 16. Zheng Y, Zhang Y, Qu R, He Y, Tian X, Zeng W. Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. *Reproduction.* 2014; 147 (3): R65–R74.
 17. Kubota H, Brinster RL. Technology Insight: *In vitro* culture of spermatogonial stem cells and their potential therapeutic uses. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006; 2 (2): 99–108.
 18. He BR, Lu F, Zhang L, Hao DJ, Yang H. An alternative long-term culture system for highly-pure mouse spermatogonial stem cells. *J Cell Physiol.* 2015; 230 (6): 1365–1375.
 19. Goossens E, Tournaye H. Adult stem cells in the human testis. *Semin Reprod Med.* 2013; 31 (1): 39–48. Review.
 20. Youn H, Kim SH, Choi KA, Kim S. Characterization of Oct4-GFP spermatogonial stem cell line and its application in the reprogramming studies. *J Cell Biochem.* 2013; 114 (4): 920–928.
 21. Lim JJ, Seol DW, Choi KH, Shin DH, Kim HJ, Song SH et al. Spermatogonial stem cell enrichment using simple grafting of testis and *in vitro* cultivation. *Sci Rep.* 2014; 4.
 22. Tegelenbosch RAJ, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutation Research.* 1993; 290 (2): 193–200.
 23. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biology of Reproduction.* 2003; 69 (2): 612–616.
 24. Gassei K, Kyle E, Orwig. Experimental Methods to Preserve Male Fertility and Treat Male Infertility. *Fertil Steril.* 2016 Feb; 105 (2): 256–266.
 25. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 16489–16494.
 26. Hamra FK, Chapman KM, Nguyen DM, Williams-Stephens AA, Hammer RE, Garbers DL. Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 17430–17435.
 27. Ryu BY, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 14302–14307.
 28. Langenstroth D, Kossack N, Westernströer B, Wistuba J, Behr R, Gromoll J, Schlatt S. Separation of somatic and germ cells is required to establish primate spermatogonial cultures. *Human Reproduction.* 2014; 29: 2018–2031.
 29. Chen B, Wang YB, Zhang ZL, Xia WL, Wang HX, Xiang ZQ et al. Xenon-free culture of human spermatogonial stem cells supported by human embryonic stem cell-derived fibroblast-like cells. *Asian journal of andrology.* 2009; 11: 557–565.
 30. Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M et al. Propagation of human spermatogonial stem cells *in vitro*. *JAMA: The journal of the American Medical Association.* 2009; 302: 2127–2134.
 31. Wu X, Schmidt JA, Avarbock MR, Tobias JW, Carlson CA, Kolon TF et al. Prepubertal human spermatogonia and mouse gonocytes share conserved gene expression of germline stem cell regulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 21672–21677.
 32. He Z, Kokkinaki M, Jiang J, Dobrinski I, Dym M. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biol Reprod.* 2010; 82: 363–372.
 33. Kokkinaki M, Djourabtchi A, Golestaneh N. Long-term culture of human ssea-4 positive spermatogonial stem cells *Journal of stem cell research and therapy.* 2011; S2: 003.
 34. Liu S, Tang Z, Xiong T, Tang W. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E.* 2011; 9: 141.
 35. Nowroozi MR, Ahmadi H, Rafiian S, Mirzapour T, Movahedin M. *In vitro* colonization of human spermatogonia stem cells: Effect of patient's clinical characteristics and testicular histologic findings. *Urology.* 2011; 78: 1075–1081.
 36. Aoshima K, Baba A, Makino Y, Okada Y. Establishment of alternative culture method for spermatogonial stem cells using knockout serum replacement. *PLoS One.* 2013; 8 (10).
 37. Kubota H, Brinster RL. Culture of rodent spermatogonial stem cells, male germline stem cells of the postnatal animal. *Methods Cell Biol.* 2008; 86: 59–84.
 38. Ryu BY, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Stem cell and niche development in the postnatal rat testis. *Dev Biol.* 2003; 263: 253–263.
 39. Ebata KT, Yeh JR, Zhang X, Nagano MC. Soluble growth factors stimulate spermatogonial stem cell divisions that maintain a stem cell pool and produce progenitors *in vitro*. *Experimental Cell Research.* 2011; 317 (10): 1319–1329.
 40. Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, Koruji M, Haron AW, Nowroozi MR, Rafieian SH. Effects of basic fibroblast growth factor and leukaemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. *Andrologia.* 2012; 44: 41–55.
 41. Sadri-Ardekani H, Akhondi MA, van der Veen F, Repping S, van Pelt AMM. *In vitro* propagation of human prepubertal spermatogonial stem cells. *The Journal of the American Medical Association.* 2011; 305 (23): 2416–2418.
 42. Guo Y, Hai Y, Gong Y, Li Z, He Z. Characterization, isolation, and culture of mouse and human spermatogonial stem cells. *J Cell Physiol.* 2014 Apr; 229 (4): 407–413. doi: 10.1002/jcp.24471.
 43. Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL. Maintenance of mouse male germ line stem cells *in vitro*. *Biology of Reproduction.* 2003; 68 (6): 2207–2214.

44. Kanatsu-Shinohara M, Takashima S, Ishii K, Shinohara T. Dynamic changes in EPCAM expression during spermatogonial stem cell differentiation in the mouse testis. *PloS One*. 2011; 6 (8): e23663.
45. Li Z, Leung M, Hopper R, Ellenbogen R, Zhang M. Feeder-free self-renewal of human embryonic stem cells in 3D porous natural polymer scaffolds. *Biomaterials*. 2010; 31(3): 404–412.
46. Lü D, Luo C, Zhang C, Li Z, Long M. Differential regulation of morphology and stemness of mouse embryonic stem cells by substrate stiffness and topography. *Biomaterials*. 2014; 35 (13): 3945–3955.
47. Nagano MC. Techniques for culturing spermatogonial stem cells continue to improve. *Biol Reprod*. 2011; 84 (1): 5–6.
48. Galuppo AG. Spermatogonial stem cells as a therapeutic alternative for fertility preservation of prepubertal boys. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015 Oct–Dec; 13 (4): 637–639. doi: 10.1590/S1679-45082015RB3456.
49. Creemers LB, den Ouden K, van Pelt AMM, de Rooij DG. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia *in vitro*: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. *Reproduction*. 2002; 124 (6): 791–799.
50. Sharma S, Wistuba J, Pock T, Schlatt S, Neuhaus N. Spermatogonial stem cells: updates from specification to clinical relevance. *Hum Reprod Update*. 2019 May 1; 25 (3): 275–297. doi: 10.1093/humupd/dmz006.
51. Камалов АА, Курпатовский ВИ, Охоботов ДА, Ефименко АЮ, Макаревич ПИ, Сагарадзе ГД и др. Использование нового биоматериала на основе продуктов секреции мезенхимальных стволовых клеток человека и коллагена для восстановления сперматогенеза на модели экспериментального крипторхизма. *Технологии живых систем*. 2017; 14 (1): 4–17. Kamalov AA, Kirpatovskiy VI, Okhobotov DA, Efimenko AYU, Makarevich PI, Sagardze GD i dr. Ispol'zovanie novogo biomateriala na osnove produktov sekretsii mezenkhimal'nykh stvolovykh kletok cheloveka i kollagena dlya vosstanovleniya spermatogeneza na modeli eksperimental'nogo kriptorkhizma. *Tekhnologii zhivyykh sistem*. 2017; 14 (1): 4–17.
52. Del Vento F, Vermeulen M, de Michele F, Giudice MG, Poels J, des Rieux A, Wyn C. Tissue engineering to improve immature testicular tissue and cell transplantation outcomes: one step closer to fertility restoration for prepubertal boys exposed to gonadotoxic treatments. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan; 19 (1): 286. Published online 2018 Jan 18. doi: 10.3390/ijms19010286.
53. Johnson EK, Finlayson C, Rowell EE, Gosiengfao Y, Pavone ME, Lockart B et al. Fertility Preservation for Pediatric Patients: Current State and Future Possibilities. *J Urol*. 2017 Jul; 198 (1): 186–194. doi: 10.1016/j.juro.2016.09.159. Epub 2017 Feb 9.
54. Moravek MB, Appiah LC, Anazodo A, Burns KC, Gomez-Lobo V, Hoefgen HR et al. Development of a Pediatric Fertility Preservation Program: A Report From the Pediatric Initiative Network of the Oncofertility Consortium. *J Adolesc Health*. 2019 May; 64 (5): 563–573. doi: 10.1016/j.jadohealth.2018.10.297. Epub 2019 Jan 14.

Статья поступила в редакцию 4.10.2019 г.
The article was submitted to the journal on 4.10.2019