

**КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СПЕРМАТОГОНИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК:  
ВОЗМОЖНОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ  
ФЕРТИЛЬНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ ПРЕДПУБЕРТАТНОГО ВОЗРАСТА**

М.В. Полякова\*

\*Сколковский институт науки и технологий (Москва)

Поддержание сперматогенеза млекопитающих зависит от наличия сперматогониальных стволовых клеток. Повреждения данных клеток, вызванные химическими или физическими воздействиями на организм, различными заболеваниями или генетической предрасположенностью, могут возникать в любом возрасте. Бесплодие, как один из побочных эффектов лечения онкологических заболеваний, является важной проблемой для пациентов и их семей. Поскольку криоконсервация спермы применима только для постпубертатных пациентов, необходима альтернатива сохранения фертильности пациентов молодого возраста, когда сперматогенез еще не начался. Одним из наиболее вероятных способов решения данной проблемы может быть криоконсервация сперматогониальных стволовых клеток. В статье проанализированы различные технологии криоконсервации, рассмотрены последние достижения в области репродуктивной медицины, открывшие новые возможности для восстановления фертильности человека. Находятся на экспериментальной стадии изучения такие методы, как криоконсервация ткани яичек, трансплантация сперматогониальных стволовых клеток, графтинг ткани яичка. Их эффективность во многом зависит от количества доступных, сохраненных сперматогониальных стволовых клеток, что доказано многочисленными исследованиями на моделях-животных. Достигнуты значительные успехи по поддержанию сперматогониальных стволовых клеток *in vitro*, выделенных из тестикул приматов, с последующей аутоотрансплантацией. Метод криоконсервации, успешно применяемый для сохранения тестикулярной ткани и суспензии тестикулярных клеток животных, перспективен в отношении тканей гонад и сперматогониальных стволовых клеток человека и, тем самым, является возможным способом сохранения его естественной фертильности. Однако на сегодняшний день данные репродуктивные технологии все еще находятся на стадии исследований, и их совершенствование в ближайшем будущем будет содействовать дальнейшему пониманию механизма сперматогенеза и его патогенеза, что может привести к положительным результатам как в лечении мужского бесплодия (особенно наиболее сложных форм), так и в его профилактике.

**Ключевые слова:** *сперматогониальные стволовые клетки, криоконсервирование, in vitro сперматогенез, восстановление фертильности, мальчики предпубертатного возраста, клеточная терапия, вспомогательные репродуктивные технологии.*

---

**Ответственный за переписку:** Полякова Мария Вячеславовна, адрес: 143026, Москва, территория инновационного центра «Сколково», ул. Нобеля, д. 3; e-mail: marusiapoliakova@gmail.com

**Для цитирования:** Полякова М.В. Криоконсервация сперматогониальных стволовых клеток: возможности клинического применения для сохранения фертильности у пациентов предпубертатного возраста // Журн. мед.-биол. исследований. 2017. Т. 5, № 3. С. 33–42. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2017.5.3.33

К настоящему времени количество супружеских пар, страдающих бесплодием, составляет около 10–15 %, причем в 50–60 % случаев причиной является мужской фактор [1]. Получение мужских половых клеток, особенно функциональных сперматид, очень важно для дальнейшего лечения мужского бесплодия с помощью вспомогательных репродуктивных технологий (artificial reproductive technologies, ART).

Многие вопросы эндокринной регуляции функций мужской репродуктивной системы хорошо изучены, существуют терапевтические методы лечения таких пациентов. Тем не менее некоторые физиологические процессы, происходящие при развитии гамет внутри яичек, в результате которых нарушается или отсутствует нормальный сперматогенез, что приводит к инфертильности, исследованы недостаточно.

Лечение онкологических заболеваний, химио- или лучевая терапия различных незлокачественных заболеваний часто серьезно повреждают гонады, что в дальнейшем может привести к бесплодию. Влияние химиотерапии на сперматогенез существенно варьирует в зависимости от комбинации используемых препаратов, и возможны негативные отдаленные воздействия на фертильность в будущем. Бесплодие является одним из побочных эффектов такого лечения и может стать наиболее существенным фактором, влияющим на психологические аспекты дальнейшей жизни. Так, около 30 % мужчин, перенесших вышеупомянутые процедуры в детстве, во взрослом возрасте страдают азооспермией [2]. Таким образом, сохранение фертильности имеет большое значение для обеспечения качества жизни этих пациентов.

В настоящее время криоконсервация спермы – это способ сохранения мужского репродуктивного потенциала с помощью дальнейшего применения ART, таких как интрацитоплазматическая инъекция спермы (intracytoplasmic sperm injection, ICSI), экстракорпоральное оплодотворение, внутриматочная инсеминация. ART с использованием спермы, криоконсервированной до начала лечения противоопухолевыми

схемами терапии, являющимися гонадотоксическими, показали хорошие результаты [3], но они неприменимы для пациентов, не достигших пубертатного возраста.

Таким образом, одним из наиболее вероятных в клиническом применении способов сохранения фертильности для молодых пациентов, которым предстоит химио- или радиотерапия, может быть криоконсервация ткани яичек, содержащей сперматогониальные стволовые клетки (ССК).

Цель данной работы – обзор существующих протоколов криоконсервации, используемых в сохранении клеток и тканей репродуктивных органов различных животных и человека. Рассмотрены такие аспекты, как восстановление, жизнеспособность, целостность и функциональность клеток и тканей. Кроме того, проанализированы биобезопасность рассматриваемых методов и перспективы сохранения мужской фертильности. Для поиска научных материалов использовались базы данных PubMed и Medline. Условия поискового запроса были определены темой исследования: криоконсервация, сохранение мужской фертильности, репродуктивная медицина, сперматогенез, ССК, гонадотоксичность, лучевая терапия и химиотерапия.

**Криоконсервация репродуктивных клеток и тканей.** При помощи криоконсервации возможно долгосрочное хранение биологических образцов (клеток и тканей) вне организма. Успехи в данной области позволили создать способы долгосрочного сохранения гамет (сперматозоидов и ооцитов), эмбрионов, репродуктивных клеток (суспензии тестикулярных клеток) и тканей (ткани яичников и тестикул) [3]. Сегодня криоконсервация ССК – это эффективный способ сохранения генетического материала. Метод криоконсервации ССК и тестикулярной ткани к настоящему времени неоднократно модифицирован и применяется в отношении клеток, выделенных из тестикул различных видов млекопитающих [4]. Многочисленные исследования подчеркнули ключевую роль жизнеспособных и функциональных ССК в эффективности дальнейших методов восстановления фертильности: пересадка ткани тестикул/яичек

(графтинг), трансплантация ССК, *in vitro* сперматогенез. Вышеупомянутые методы успешно применяются для восстановления сперматогенеза животных почти два последних десятилетия и являются перспективными для будущего клинического применения в репродукции человека в т. ч. и для пациентов предпубертатного периода (см. рисунок) [5].



Клиническая технология сохранения ткани яичек, содержащей сперматогонимальные стволовые клетки (ССК), для пациентов предпубертатного периода с высоким риском бесплодия

Успех применения метода криоконсервации тканей и/или клеток зависит от понимания биологических основ данного процесса, в т. ч. как от выбора криопротектора и его концентрации, так и от процедур замораживания, хранения, транспортировки и последующего размораживания, в ходе которых количество ССК уменьшается [4].

**Сравнительный анализ способов замораживания.** На сегодняшний день наиболее часто используются две процедуры криоконсервации: медленное (с контролируемой или неконтролируемой скоростью охлаждения) замораживание и витрификация. В течение процедуры медленного замораживания обезвоживание клеток происходит постепенно, по мере снижения температуры. Это ведет к уменьшению образования как межклеточных контактов, так и контактов

между льдом и клеткой, тем самым снижая риск формирования внутриклеточного льда, повреждающего клетки, что особенно важно при криоконсервации тканей. Помимо этого, медленное замораживание помогает избежать токсического воздействия на клетки, т. к. для данной процедуры, как правило, требуются низкие концентрации криопротектора.

В исследованиях с использованием медленного замораживания ткани яичек пациентов предпубертатного возраста наилучшие результаты среди криопротекторов (в т. ч. этиленгликоля, пропандиола и глицерина) показал диметилсульфоксид (ДМСО). Данный вывод был основан на гистологическом анализе структуры тканей, а также на жизнеспособности размороженных клеток, в т. ч. сперматогониев, клеток Сертоли, интерстициальных клеток [6].

Применение медленного замораживания клеток в клинических условиях занимает много времени, кроме того, существует большая вероятность травматизации клеток, особенно это касается фрагментов тканей. Как правило, температура внутри образца ткани меняется более медленно по сравнению с клеточной суспензией, что также должно быть принято во внимание. В этом отношении метод витрификации является, возможно, более рациональным. При витрификации используются криозащитный раствор с более высокой осмолярностью (в отличие от криопротекторных сред, применяемых для медленного замораживания), а также более высокая скорость охлаждения: образцы материала немедленно помещаются в жидкий азот, что дает возможность завершить всю процедуру криоконсервации в короткий срок и снизить возможность образования внеклеточных кристаллов льда. Витрификация используется для криоконсервации ооцитов в течение последнего десятилетия. Недавно появились сообщения об успешном применении данного метода при сохранении сперматогониев и ткани яичек человека, что было подтверждено гистологическими исследованиями [7]. Тем не менее на данный момент остается неясным, какой метод (медленное замораживание или витрификация) более оптимален для использования.

**Трансплантация ССК.** Группой исследователей под руководством R. Brinster в 1994 году была разработана техника трансплантации сперматогониальных клеток, в ходе которой тестикулярные клетки, полученные от мыши-донора, были введены в семявыносящие каналцы мышей-реципиентов, у которых эндогенный сперматогенез предварительно заблокировали с помощью бусульфана [8]. Это дало возможность дальнейшего изучения ССК, идентификации специфических молекулярных маркеров половых клеток для их изоляции, культивирования *in vitro* и мониторинга *in vivo* после введения клеток данного типа реципиенту. Однако метод трансплантации необходимо модифицировать для отдельных видов животных в зависимости от гисто-анатомической структуры их семенников. Эффективность вышеуказанного метода наиболее высока в экспериментах с мышами [9].

Также была изучена ксенотрансплантация клеток, выделенных из тестикул доноров – различных видов животных в тестикулы реципиентов – иммунодефицитных мышей. Данный метод оказался успешным только при использовании клеток, полученных от крыс и хомяков, т. е. видов, филогенетически близких [10].

Повторное введение ССК в яичко донора продемонстрировано в экспериментах с человеком. Была проведена аутотрансплантация ССК пациентов с лимфомой Ходжкина. Половые клетки взрослых пациентов были собраны и криоконсервированы перед началом лечения, затем трансплантированы в семявыносящие каналцы каждого пациента после лечения. О дальнейших результатах исследований не сообщалось [11]. Это свидетельствует о том, что введение половых клеток в семявыносящие каналцы человека технически возможно, но производство сперматозоидов таким образом не является достаточно клинически применимым в настоящее время.

Хотя вышеупомянутыми исследованиями показано, что фертильность животных может быть восстановлена путем пересадки ткани тестикул и трансплантации ССК, остается открытым вопрос, могут ли быть приемлемы эти методы в отношении репродукции человека.

На сегодняшний день недостаточно информации, касающейся безопасности клинического применения описанных методов с целью восстановления мужской фертильности. При проведении реимплантации возможна контаминация гамет пациента злокачественными клетками. В экспериментах на крысах показано, что трансплантация всего лишь 20 лейкозных клеток в семенник обуславливает рецидивы злокачественных заболеваний [12]. Таким образом, оценка рисков переноса канцерогенных клеток является важным шагом в предложенном методе восстановления фертильности. Количество злокачественных клеток, способных вызывать рецидив заболевания после реимплантации в яичко человека, неизвестно. Поэтому имеет огромное значение обнаружение контаминаций во взятых образцах ССК и тканей.

В ряде исследований [13–15] описаны технологии сортировки клеток, помогающие ликвидировать возможные злокачественные клетки: флуоресцентная/магнитная сортировка клеток (fluorescence activated cell sorting, FASC; magnetic bead cell sorting); метод селекции, основанный на разных адгезивных способностях клеток; селективная система культивирования клеток. K. Fujita с коллегами показали, что FASC способствует удалению лейкозных клеток из тканей тестикул с целью исключения рецидива данного заболевания у мышей [16].

В рамках изучения методов культивирования было выявлено, что поддержание *in vitro* культуры клеток яичек человека в течение 26 сут избирательно уничтожает контаминирующие клетки острой лимфобластной лейкемии [17].

С другой стороны, результаты по очистке ССК от контаминации неоднозначны [15, 17]. Агрегация половых и злокачественных клеток, недостаток специфических маркеров для выявления ССК препятствуют применению положительной селекции именно гамет.

**Культивирование ССК и *in vitro* сперматогенез.** Значительным достижением ученых явилось определение глиального нейротрофического фактора ключевым для самообновления ССК, что дало возможность в дальнейшем

использовать его при создании долгосрочной культуры половых клеток [4, 18].

К настоящему времени метод поддержания ССК *in vitro* неоднократно модифицирован и применяется в отношении клеток, выделенных из тестикул различных видов млекопитающих, в т. ч. крыс, кроликов, хомяков, хряков, быков [4]. Были проведены исследования по поддержанию *in vitro* культуры ССК человека [17]. Тем не менее на сегодняшний день достигнутые результаты не являются оптимальными для успешного использования их в практике.

Методы культивирования клеток включают использование линий иммортализованных половых клеток, различных соматических клеток, в т. ч. клеток Сертоли, в качестве фидерных слоев [4, 19], но, несмотря на это, прогресс в данной области до недавнего времени был ограничен – не представлялось возможным получение полноценных гаплоидных клеток в процессе культивирования ССК [19–21].

Недавно была предложена новая трехмерная клеточная культура на основе агара (soft agar culture system, SACS), создающая условия, необходимые для обеспечения полноценного развития мужских половых клеток мыши *in vitro*. При культивировании с использованием SACS сперматогонии дифференцировались в морфологически нормальные сперматозоиды, однако эффективность данного метода являлась очень низкой [22].

Успех стратегии восстановления фертильности с использованием 3D-культивирования может зависеть от реконструкции небольших функциональных кластеров клеток тестикул внутри матрицы, полностью напоминающей микроокружение или архитектуру семявыносящих канальцев; таким образом, будет возможно создавать небольшие очаги полного сперматогенеза.

Восстановление сперматогенеза у млекопитающих – единственный доступный способ оценки функций ССК именно как стволовых клеток. Кроме того, эффективность протоколов криоконсервации также может быть исследована путем проведения трансплантации, но в отношении ССК человека это пока не представляется возможным.

Трудности по сохранению жизнеспособных ССК и их дальнейшей дифференцировке в зрелые клетки, тем не менее, можно преодолеть с помощью биотехнологических достижений в данной и смежных сферах науки, которые произошли за последнее время. В 2011 году группой исследователей был успешно осуществлен экстракорпоральный сперматогенез у мышей при применении органной культуры с целью воссоздания микроокружения, подобного гистологическому строению тестикул [23]. Далее с помощью метода органной культуры были получены гаплоидные клетки из фрагментов ткани тестикул, криоконсервированных путем медленного замораживания и витрификации. При проведении процедур ICSI и инъекции круглых сперматид (round spermatid injection) с использованием таких клеток было получено жизнеспособное потомство мышей [24].

Очевидно, что подобные технологии, основанные на применении стволовых клеток, в будущем дадут возможность сохранить фертильность у пациентов предпубертатного возраста с помощью криоконсервации ткани яичка и дальнейшего получения *in vitro* сперматид или сперматозоидов.

**Генетическая безопасность применения экспериментальных методов сохранения и восстановления фертильности.** Исследования показали, что фертильность млекопитающих может быть восстановлена методами трансплантации ССК или *in vitro* сперматогенеза, но остается вопрос, являются ли данные методы безопасными для применения в репродукции человека.

К настоящему времени недостаточно экспериментальных данных, которые указывают на эпигенетические факторы, влияющие на половые клетки и интенсивность сперматогенеза [25]. Обнаружено, что ДМСО способен вызывать эпигенетические изменения в ССК в течение периода криоконсервации [26].

В то же время культивирование ССК мыши и крысы позволило создать полный сперматогенез и с помощью полученных гамет получить потомство без видимых генетических изменений, причем половые клетки были подвергнуты

замораживанию более 14 лет [27]. Кроме того, генетическую стабильность и способность к дальнейшей дифференцировке в гаплоидные клетки наблюдали после переноса культивированных ССК, ранее подвергнутых криоконсервации, реципиенту с заблокированным эндогенным сперматогенезом [28].

В экспериментах с приматами, не относящимися к человекообразным, была показана возможность получения спермы с использованием ССК, выделенных из фрагментов ткани тестикул, замороженных ранее. Сперматозоиды были способны к экстракорпоральному оплодотворению ооцитов с последующим развитием эмбрионов, что предполагает их нормальную функциональную способность. К сожалению, нет никаких доказательств нормального формирования эмбрионов в дальнейшем [29]. Необходимо проведение дополнительных исследований с целью изучения генетического потенциала подвергнутых криоконсервированию образцов тканей тестикул животных (яичек человека),

ССК и возможных эпигенетических изменений в них, а также потомстве, полученном с использованием таких половых клеток.

В связи с вышеизложенным очевидно, что криоконсервация ССК перед началом лечения, дальнейшее получение полноценных гамет с помощью *in vitro* сперматогенеза в будущем дадут возможность сохранить репродуктивную способность пациентов и станут адекватными подходами к лечению андрологических заболеваний в клинических условиях, в частности помогут сохранению фертильности у детей, перенесших онкологические заболевания.

Дальнейшие исследования ССК человека необходимы для получения данных о мужской репродуктивной физиологии и патологии, а также для изучения молекулярных и клеточных механизмов различных дефектов сперматогенеза. Данное направление поможет создавать новые методы профилактики, диагностики и лечения мужского бесплодия с применением клеточных технологий.

### Список литературы

1. *Inhorn M.C., Patrizio P.* Infertility Around the Globe: New Thinking on Gender, Reproductive Technologies and Global Movements in the 21st Century // *Hum. Reprod. Update.* 2015. Vol. 21, № 4. P. 411–426.
2. *Tschudin S., Bitzer J.* Psychological Aspects of Fertility Preservation in Men and Women Affected by Cancer and Other Life-Threatening Diseases // *Hum. Reprod. Update.* 2009. Vol. 15, № 5. P. 587–597.
3. *Anderson R.A., Mitchell R.T., Kelsey T.W., Spears N., Telfer E.E., Wallace W.H.B.* Cancer Treatment and Gonadal Function: Experimental and Established Strategies for Fertility Preservation in Children and Young Adults // *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015. Vol. 3, № 7. P. 556–567.
4. *Полякова М.В.* Влияние условий культивирования на поддержание сперматогоний хряка *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2013. 27 с.
5. *Sato T., Katagiri K., Kubota Y., Ogawa T.* *In vitro* Sperm Production from Mouse Spermatogonial Stem Cell Lines Using an Organ Culture Method // *Nat. Protoc.* 2013. Vol. 8, № 11. P. 2098–2104.
6. *Keros V., Hultenby K., Borgström B., Fridström M., Jahnukainen K., Hovatta O.* Methods of Cryopreservation of Testicular Tissue with Viable Spermatogonia in Pre-Pubertal Boys Undergoing Gonadotoxic Cancer Treatment // *Hum. Reprod.* 2007. Vol. 22, № 5. P. 1384–1395.
7. *Poels J., Van Langendonck A., Many M.C., Wese F.X., Wyns C.* Vitrification Preserves Proliferation Capacity in Human Spermatogonia // *Hum. Reprod.* 2013. Vol. 28. P. 578–589.
8. *Brinster R.L., Zimmermann J.W.* Spermatogenesis Following Male Germ-Cell Transplantation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. Vol. 91, № 24. P. 11298–11302.
9. *Shinohara T., Inoue K., Ogonuki N., Kanatsu-Shinohara M., Miki H., Nakata K., Kurome M., Nagashima H., Toyokuni S., Kogishi K., Honjo T., Ogura A.* Birth of Offspring Following Transplantation of Cryopreserved

Immature Testicular Pieces and *in vitro* Microinsemination // Hum. Reprod. 2002. Vol. 17, № 12. P. 3039–3045.

10. Pothana L., Makala H., Devi L., Varma V.P., Goel S. Germ Cell Differentiation in Cryopreserved, Immature, Indian Spotted Mouse Deer (*Moschiola indica*) Testes Xenografted onto Mice // Theriogenology. 2015. Vol. 83, № 4. P. 625–633.

11. Radford J. Restoration of Fertility After Treatment for Cancer // Horm. Res. 2003. Vol. 59, suppl. 1. P. 21–23.

12. Jahnukainen K., Hou M., Petersen C., Setchell B., Söder O. Intratesticular Transplantation of Testicular Cells from Leukemic Rats Causes Transmission of Leukemia // Cancer Res. 2001. Vol. 61, № 2. P. 706–710.

13. Geens M., Goossens E., Tournaye H. Cell Selection by Selective Matrix Adhesion Is Not Sufficiently Efficient for Complete Malignant Cell Depletion from Contaminated Human Testicular Cell Suspensions // Fertil. Steril. 2011. Vol. 95, № 2. P. 787–791.

14. Geens M., Van de Velde H., De Block G., Goossens E., Van Steirteghem A., Tournaye H. The Efficiency of Magnetic-Activated Cell Sorting and Fluorescence-Activated Cell Sorting in the Decontamination of Testicular Cell Suspensions in Cancer Patients // Hum. Reprod. 2007. Vol. 22, № 3. P. 733–742.

15. Dovey S.L., Valli B., Hermann B.P., Sukhwani M., Donohue J., Castro C.A., Chu T., Sanfilippo J.S., Orwig K.E. Eliminating Malignant Contamination from Therapeutic Human Spermatogonial Stem Cells // J. Clin. Invest. 2013. Vol. 123, № 4. P. 1833–1843.

16. Fujita K., Ohta H., Tsujimura A., Takao T., Miyagawa Y., Takada S., Matsumiya K., Wakayama T., Okuyama A. Transplantation of Spermatogonial Stem Cells Isolated from Leukemic Mice Restores Fertility Without Inducing Leukemia // J. Clin. Invest. 2005. Vol. 115, № 7. P. 1855–1861.

17. Sadri-Ardekani H., Homburg C.H., van Capel T.M., van den Berg H., van der Veen F., van der Schoot C.E., van Pelt A.M., Repping S. Eliminating Acute Lymphoblastic Leukemia Cells from Human Testicular Cell Cultures: A Pilot Study // Fertil. Steril. 2014. Vol. 101, № 4. P. 1072–1078.

18. Meng X., Lindahl M., Hyvönen M.E., Parvinen M., de Rooij D.G., Hess M.W., Raatikainen-Ahokas A., Sainio K., Rauvala H., Lakso M., Pichel J.G., Westphal H., Saarma M., Sariola H. Regulation of Cell Fate Decision of Undifferentiated Spermatogonia by GDNF // Science. 2000. Vol. 287, № 5457. P. 1489–1493.

19. Rassoulzadegan M., Paquis-Flucklinger V., Bertino B., Sage J., Jasin M., Miyagawa K., van Heyningen V., Besmer P., Cuzin F. Transmeiotic Differentiation of Male Germ Cells in Culture // Cell. 1993. Vol. 75. P. 997–1006.

20. Staub C. A Century of Research on Mammalian Male Germ Cell Meiotic Differentiation *in vitro* // J. Androl. 2001. Vol. 22. P. 911–926.

21. La Salle S., Sun F., Handel M.A. Isolation and Short-Term Culture of Mouse Spermatocytes for Analysis of Meiosis // Methods Mol. Biol. 2009. Vol. 558. P. 279–297.

22. Abu Elhija M., Lunenfeld E., Schlatt S., Huleihel M. Differentiation of Murine Male Germ Cells to Spermatozoa in a Soft Agar Culture System // Asian J. Androl. 2012. Vol. 14, № 2. P. 285–293.

23. Sato T., Katagiri K., Gohbara A., Inoue K., Ogonuki N., Ogura A., Kubota Y., Ogawa T. *In vitro* Production of Functional Sperm in Cultured Neonatal Mouse Testes // Nature. 2011. Vol. 471. P. 504–507.

24. Yokonishi T., Sato T., Komeya M., Katagiri K., Kubota Y., Nakabayashi K., Hata K., Inoue K., Ogonuki N., Ogura A., Ogawa T. Offspring Production with Sperm Grown *in vitro* from Cryopreserved Testis Tissues // Nat. Commun. 2014. Vol. 5. Art. № 4320.

25. Полякова М.В. Перспективы использования сперматогонимальных стволовых клеток при изучении механизмов сперматогенеза и лечения мужского бесплодия // Андрология и генит. хирургия. 2016. Т. 17, № 4. С. 17–20.

26. Kawai K., Li Y.S., Song M.F., Kasai H. DNA Methylation by Dimethyl Sulfoxide and Methionine Sulfoxide Triggered by Hydroxyl Radical and Implications for Epigenetic Modifications // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010. Vol. 20, № 1. P. 260–265.

27. Wu X., Goodyear S.M., Abramowitz L.K., Bartolomei M.S., Tobias J.W., Avarbock M.R., Brinster R.L. Fertile Offspring Derived from Mouse Spermatogonial Stem Cells Cryopreserved for More Than 14 Years // Hum. Reprod. 2012. Vol. 27, № 5. P. 1249–1259.

28. Yuan Z., Hou R., Wu J. Generation of Mice by Transplantation of an Adult Spermatogonial Cell Line After Cryopreservation // Cell Prolif. 2009. Vol. 42, № 2. P. 123–131.

29. Hermann B.P., Sukhwani M., Winkler F., Pascarella J.N., Peters K.A., Sheng Y., Valli H., Rodriguez M., Ezzelarab M., Dargo G., Peterson K., Masterson K., Ramsey C., Ward T., Lienesch M., Volk A., Cooper D.K., Thomson A.W., Kiss J.E., Penedo M.C., Schatten G.P., Mitalipov S., Orwig K.E. Spermatogonial Stem Cell Transplantation into Rhesus Testes Regenerates Spermatogenesis Producing Functional Sperm // *Cell Stem Cell*. 2012. Vol. 11, № 5. P. 715–726.

## References

1. Inhorn M.C., Patrizio P. Infertility Around the Globe: New Thinking on Gender, Reproductive Technologies and Global Movements in the 21st Century. *Hum. Reprod. Update*, 2015, vol. 21, no. 4, pp. 411–426.
2. Tschudin S., Bitzer J. Psychological Aspects of Fertility Preservation in Men and Women Affected by Cancer and Other Life-Threatening Diseases. *Hum. Reprod. Update*, 2009, vol. 15, no. 5, pp. 587–597.
3. Anderson R.A., Mitchell R.T., Kelsey T.W., Spears N., Telfer E.E., Wallace W.H.B. Cancer Treatment and Gonadal Function: Experimental and Established Strategies for Fertility Preservation in Children and Young Adults. *Lancet Diabetes Endocrinol.*, 2015, vol. 3, no. 7, pp. 556–567.
4. Polyakova M.V. *Vliyanie usloviy kul'tivirovaniya na podderzhanie spermatogoniy khryaka in vitro*: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk [Effect of Cultivation Conditions on the Maintenance of Boar Spermatogonia *in vitro*: Cand. Biol. Sci. Diss. Abs.]. Moscow, 2013. 27 p.
5. Sato T., Katagiri K., Kubota Y., Ogawa T. *In vitro* Sperm Production from Mouse Spermatogonial Stem Cell Lines Using an Organ Culture Method. *Nat. Protoc.*, 2013, vol. 8, no. 11, pp. 2098–2104.
6. Keros V., Hulthenby K., Borgström B., Fridström M., Jahnukainen K., Hovatta O. Methods of Cryopreservation of Testicular Tissue with Viable Spermatogonia in Pre-Pubertal Boys Undergoing Gonadotoxic Cancer Treatment. *Hum. Reprod.*, 2007, vol. 22, no. 5, pp. 1384–1395.
7. Poels J., Van Langendonck A., Many M.C., Wese F.X., Wyns C. Vitrification Preserves Proliferation Capacity in Human Spermatogonia. *Hum. Reprod.*, 2013, vol. 28, pp. 578–589.
8. Brinster R.L., Zimmermann J.W. Spermatogenesis Following Male Germ-Cell Transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, no. 24, pp. 11298–11302.
9. Shinohara T., Inoue K., Ogonuki N., Kanatsu-Shinohara M., Miki H., Nakata K., Kurome M., Nagashima H., Toyokuni S., Kogishi K., Honjo T., Ogura A. Birth of Offspring Following Transplantation of Cryopreserved Immature Testicular Pieces and *in vitro* Microinsemination. *Hum. Reprod.*, 2002, vol. 17, no. 12, pp. 3039–3045.
10. Pothana L., Makala H., Devi L., Varma V.P., Goel S. Germ Cell Differentiation in Cryopreserved, Immature, Indian Spotted Mouse Deer (*Moschiola indica*) Testes Xenografted onto Mice. *Theriogenology*, 2015, vol. 83, no. 4, pp. 625–633.
11. Radford J. Restoration of Fertility After Treatment for Cancer. *Horm. Res.*, 2003, vol. 59, suppl. 1, pp. 21–23.
12. Jahnukainen K., Hou M., Petersen C., Setchell B., Söder O. Intratesticular Transplantation of Testicular Cells from Leukemic Rats Causes Transmission of Leukemia. *Cancer Res.*, 2001, vol. 61, no. 2, pp. 706–710.
13. Geens M., Goossens E., Tournaye H. Cell Selection by Selective Matrix Adhesion Is Not Sufficiently Efficient for Complete Malignant Cell Depletion from Contaminated Human Testicular Cell Suspensions. *Fertil. Steril.*, 2011, vol. 95, no. 2, pp. 787–791.
14. Geens M., Van de Velde H., De Block G., Goossens E., Van Steirteghem A., Tournaye H. The Efficiency of Magnetic-Activated Cell Sorting and Fluorescence-Activated Cell Sorting in the Decontamination of Testicular Cell Suspensions in Cancer Patients. *Hum. Reprod.*, 2007, vol. 22, no. 3, pp. 733–742.
15. Dovey S.L., Valli B., Hermann B.P., Sukhwani M., Donohue J., Castro C.A., Chu T., Sanfilippo J.S., Orwig K.E. Eliminating Malignant Contamination from Therapeutic Human Spermatogonial Stem Cells. *J. Clin. Invest.*, 2013, vol. 123, no. 4, pp. 1833–1843.
16. Fujita K., Ohta H., Tsujimura A., Takao T., Miyagawa Y., Takada S., Matsumiya K., Wakayama T., Okuyama A. Transplantation of Spermatogonial Stem Cells Isolated from Leukemic Mice Restores Fertility Without Inducing Leukemia. *J. Clin. Invest.*, 2005, vol. 115, no. 7, pp. 1855–1861.
17. Sadri-Ardekani H., Homburg C.H., van Capel T.M., van den Berg H., van der Veen F., van der Schoot C.E., van Pelt A.M., Repping S. Eliminating Acute Lymphoblastic Leukemia Cells from Human Testicular Cell Cultures: A Pilot Study. *Fertil. Steril.*, 2014, vol. 101, no. 4, pp. 1072–1078.



18. Meng X., Lindahl M., Hyvönen M.E., Parvinen M., de Rooij D.G., Hess M.W., Raatikainen-Ahokas A., Sainio K., Rauvala H., Lakso M., Pichel J.G., Westphal H., Saarma M., Sariola H. Regulation of Cell Fate Decision of Undifferentiated Spermatogonia by GDNF. *Science*, 2000, vol. 287, no. 5457, pp. 1489–1493.
19. Rassoulzadegan M., Paquis-Flucklinger V., Bertino B., Sage J., Jasin M., Miyagawa K., van Heyningen V., Besmer P., Cuzin F. Transmeiotic Differentiation of Male Germ Cells in Culture. *Cell*, 1993, vol. 75, no. 5, pp. 997–1006.
20. Staub C. A Century of Research on Mammalian Male Germ Cell Meiotic Differentiation *in vitro*. *J. Androl.*, 2001, vol. 22, no. 6, pp. 911–926.
21. La Salle S., Sun F., Handel M.A. Isolation and Short-Term Culture of Mouse Spermatocytes for Analysis of Meiosis. *Methods Mol. Biol.*, 2009, vol. 558, pp. 279–297.
22. Abu Elhija M., Lunenfeld E., Schlatt S., Huleihel M. Differentiation of Murine Male Germ Cells to Spermatozoa in a Soft Agar Culture System. *Asian J. Androl.*, 2012, vol. 14, no. 2, pp. 285–293.
23. Sato T., Katagiri K., Gohbara A., Inoue K., Ogonuki N., Ogura A., Kubota Y., Ogawa T. *In vitro* Production of Functional Sperm in Cultured Neonatal Mouse Testes. *Nature*, 2011, vol. 471, pp. 504–507.
24. Yokonishi T., Sato T., Komeya M., Katagiri K., Kubota Y., Nakabayashi K., Hata K., Inoue K., Ogonuki N., Ogura A., Ogawa T. Offspring Production with Sperm Grown *in vitro* from Cryopreserved Testis Tissues. *Nat. Commun.*, 2014, vol. 5. Art. no. 4320.
25. Polyakova M.V. Perspektivy ispol'zovaniya spermatogonial'nykh stvolovykh kletok pri izuchenii mekhanizmov spermatogeneza i lechenii muzhskogo besplodiya [Prospects for the Use of Spermatogonial Stem Cells for Studying the Mechanisms of Spermatogenesis and Treatment of Male Infertility]. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya*, 2016, vol. 17, no. 4, pp. 17–20.
26. Kawai K., Li Y.S., Song M.F., Kasai H. DNA Methylation by Dimethyl Sulfoxide and Methionine Sulfoxide Triggered by Hydroxyl Radical and Implications for Epigenetic Modifications. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, vol. 20, no. 1, pp. 260–265.
27. Wu X., Goodyear S.M., Abramowitz L.K., Bartolomei M.S., Tobias J.W., Avarbock M.R., Brinster R.L. Fertile Offspring Derived from Mouse Spermatogonial Stem Cells Cryopreserved for More Than 14 Years. *Hum. Reprod.*, 2012, vol. 27, no. 5, pp. 1249–1259.
28. Yuan Z., Hou R., Wu J. Generation of Mice by Transplantation of an Adult Spermatogonial Cell Line After Cryopreservation. *Cell Prolif.*, 2009, vol. 42, no. 2, pp. 123–131.
29. Hermann B.P., Sukhwani M., Winkler F., Pascarella J.N., Peters K.A., Sheng Y., Valli H., Rodriguez M., Ezzelarab M., Dargo G., Peterson K., Masterson K., Ramsey C., Ward T., Lienesch M., Volk A., Cooper D.K., Thomson A.W., Kiss J.E., Penedo M.C., Schatten G.P., Mitalipov S., Orwig K.E. Spermatogonial Stem Cell Transplantation into Rhesus Testes Regenerates Spermatogenesis Producing Functional Sperm. *Cell Stem Cell*, 2012, vol. 11, no. 5, pp. 715–726.

DOI: 10.17238/issn2542-1298.2017.5.3.33

*Mariya V. Polyakova\**

\*Skolkovo Institute of Science and Technology (Moscow, Russian Federation)

### **CRYOPRESERVATION OF SPERMATOGONIAL STEM CELLS: ITS CLINICAL USE FOR FERTILITY PRESERVATION IN PREPUBERTAL PATIENTS**

Maintenance of mammalian spermatogenesis depends on the presence of spermatogonial stem cells (SSCs). SSC damage caused by chemical or physical actions on the body, various diseases or genetic predisposition can occur at any age. Infertility, as one of the side effects of cancer treatment, is an important issue for patients and their families. Since semen cryopreservation is applicable only

for postpubertal patients, an alternative is required to preserve fertility in younger patients whose spermatogenesis has not yet begun. One of the most likely solutions is SSC cryopreservation. This paper analysed various methods of cryopreservation and studied recent advances in reproductive medicine opening up new opportunities for human fertility restoration. Such methods as testicular tissue cryopreservation, SSC transplantation, and testicular tissue grafting are at the experimental stage. However, their effectiveness largely depends on the amount of available stored SSCs, which has been proved by numerous studies on animal models. There has been significant progress in SSC maintenance *in vitro*, isolated from the testicles of primates, with subsequent autotransplantation. Cryopreservation, successfully used to preserve testicular tissue and suspensions of animal testicular cells, is a promising method for human gonadal tissues and SSCs and thus can be an alternative way to preserve natural fertility. However, today these reproductive technologies are still at the research stage, and their improvement in the near future will advance further understanding of the mechanism of spermatogenesis and its pathogenesis, which can result in more effective treatment of male infertility (even the most severe forms) and its prevention.

**Keywords:** *spermatogonial stem cells, cryopreservation, in vitro spermatogenesis, fertility restoration, prepubertal boys, cell therapy, assisted reproductive technologies.*

Поступила 28.01.2017  
Received 28 January 2017

---

**Corresponding author:** Mariya Polyakova, *address:* ul. Nobelya 3, Skolkovo Innovation Center, Moscow, 143026, Russian Federation; *e-mail:* marusiapoliakova@gmail.com

**For citation:** Polyakova M.V. Cryopreservation of Spermatogonial Stem Cells: Its Clinical Use for Fertility Preservation in Prepubertal Patients. *Journal of Medical and Biological Research*, 2017, vol. 5, no. 3, pp. 33–42. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2017.5.3.33