



Перспективы использования сперматогонциальных стволовых клеток при изучении механизмов сперматогенеза и лечении мужского бесплодия

М.В. Полякова

Лаборатория генетики нарушений репродукции ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»;
Россия, 115478 Москва, ул. Москворечье, 1

Контакты: Мария Вячеславовна Полякова marusiapoliakova@gmail.com

Половые стволовые клетки определяются способностью передачи генетической информации следующему поколению посредством оплодотворения. Ключ к непрерывному производству сперматозоидов – сперматогонциальные стволовые клетки (ССК). Лечение злокачественных заболеваний (химио- или лучевая терапия) может привести к серьезному повреждению мужской репродуктивной функции.

Недавние открытия в исследованиях по изучению сперматогенной системы млекопитающих позволили расширить знания о клеточных и молекулярных механизмах дифференцировки сперматогониев в зрелые гаметы. Однако в настоящее время природа сперматогенеза человека практически неизвестна из-за отсутствия соответствующей экспериментальной модели. Создание метода культивирования ССК человека в ближайшем будущем будет содействовать дальнейшему пониманию механизма сперматогенеза и его патогенеза, что может привести к более результативным показателям при применении вспомогательных репродуктивных технологий как в лечении наиболее сложных форм мужского бесплодия, так и в его профилактике. В обзоре проанализированы результаты исследований, изучающих возможность применения клеточных технологий в репродуктивной медицине для восстановления сперматогенеза человека. Рядом авторов показано, что применение криоконсервации не только спермы, но и ткани яичек, содержащей ССК, аутотрансплантация ССК, создание органных культур в целях получения сперматозоидов *in vitro* в будущем могут стать действенными способами сохранения фертильности, особенно у пациентов препубертатного возраста. Однако полученные результаты неоднозначны и требуют дальнейших исследований.

Ключевые слова: сперматогонциальные стволовые клетки, бесплодие, сперматогенез *in vitro*, яичко, трансплантация, вспомогательные репродуктивные технологии, фертильность

DOI: 10.17650/2070-9781-2016-17-4-17-20

Perspectives of spermatogonial stem cells use for investigation of spermatogenesis mechanisms and for treatment of male infertility

M. V. Polyakova

Laboratory of genetic disorders of reproduction, Research Centre for Medical Genetics;
1 Moskvorech'e St., Moscow 115478, Russia

Germ stem cells have the ability to transfer genetic information to the next generation through fertilization. The key to continuous production of sperm cells – spermatogonial stem cells (SSC). Treatment of malignant diseases, chemotherapy or radiation therapy, can cause serious damage to male reproductive function. Recent discoveries in studies of the mammalian spermatogenic system had expanded the knowledge about the cellular and molecular mechanisms of differentiation of spermatogonia into mature gametes. Currently, however, the nature of the human spermatogenesis almost unknown due to the lack of appropriate experimental models. Create a method of culture human SSC in the near future will contribute to the further understanding of the mechanism of spermatogenesis and its pathogenesis, which may lead to more effective indicators for the use of assisted reproductive technologies in treating the most severe forms of male infertility, and its prevention. The review analyzed the results of studies the possibility of using cellular technologies in reproductive medicine to restore human spermatogenesis. A number of authors have shown that the use of cryopreservation not only sperm, but also tissues of testicles that contains SSC, auto-transplantation of SSC, the establishment of organ cultures with the aim of obtaining sperm *in vitro* may in future be an effective method of fertility preservation, especially in prepubertal patients. However, the results are ambiguous and need further researches.

Key words: spermatogonial stem cells, infertility, *in vitro* spermatogenesis, testis, transplantation, assisted reproductive technologies, fertility



Сперматогенез – сложный процесс, который предполагает взаимодействие половых и соматических клеток яичек. Поддержание сперматогенеза млекопитающих зависит от наличия сперматогониальных стволовых клеток (ССК).

ССК играют ключевую роль в сперматогенезе. Во-первых, они являются клетками, лежащими в основе процесса сперматогенеза. Последующие клеточные процессы до образования сперматозоидов в семявыносящих канальцах протекают упорядоченно. Во-вторых, ССК способствуют сперматогенезу на протяжении всей жизни мужчины благодаря их функции именно как стволовых клеток. Другими словами, ССК поддерживают самообновление, что облегчает продолжение сперматогенеза и является фундаментальным механизмом. В-третьих, физиологические или патологические нарушения процесса сперматогенеза могут быть отрегулированы или восстановлены с помощью ССК [1]. Наряду с этим ССК должны поддерживать целостность ДНК для ее эффективной передачи следующему поколению. Таким образом, ССК – не только один из типов стволовых клеток, это клетки, обеспечивающие продолжение жизни вида.

Различают несколько подтипов сперматогониев млекопитающих: А0, А1, А2, А3, А4, В, промежуточные сперматогонии. Исходя из их числа, размера, морфологии ядра и гетерохроматина, митотического клеточного цикла, очевидно, что ССК – это именно сперматогонии типа А0. Для человека характерно 6 типов сперматогониев [2].

Количество ССК мало и составляет < 1 % от числа всех половых клеток в тестикулах взрослых мышей [3]. Этот факт, наряду с отсутствием специфических маркеров для выявления ССК, препятствует их изучению. Данные трудности преодолевают с помощью технологических достижений, которые произошли за последние 2 десятилетия в этой и смежных областях науки. В настоящем обзоре мы суммируем и описываем недавний прогресс в исследованиях ССК и обсуждаем дальнейшие перспективы.

Значительное достижение, такое как создание техники трансплантации сперматогониальных клеток, было предоставлено группой исследователей под руководством R. Brinster в 1994 г. [4]. 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 [5], применение ксенотрансплантации [6, 7]. В 2000 г. было определено, что глиальный нейротрофический фактор является ключевым в самообновлении ССК, что дало возможность использовать его при создании долгосрочной культуры половых клеток [8].

Метод поддержания ССК *in vitro* к настоящему времени был неоднократно модифицирован, его применяют

в отношении клеток, выделенных из тестикул различных видов млекопитающих, в том числе крыс, хомяков, кроликов, хряков, быков [9–13]. Также были проведены исследования *in vitro* по поддержанию культуры ССК человека [14]. Тем не менее условия культивирования не являются оптимальными для успешного применения их на практике.

Одно из наиболее перспективных направлений в клиническом применении – криоконсервация ССК молодых пациентов, которым предстоит химио- или радиотерапия. Так как около 23–30 % пациентов после подобного курса лечения страдают азооспермией, это является единственным способом сохранения их фертильности перед лечением [15, 16], что неприемлемо, если они еще не вступили в период полового созревания, т. е. сперматогенез еще не начался. Однако с развитием метода трансплантации в семявыносящие канальцы, как отмечалось выше, повторное введение ССК в яичко донора становится возможным способом, при котором процесс сперматогенеза может быть восстановлен, что было продемонстрировано в экспериментах с приматами [17] и человеком [18]. Предпринималась ауто трансплантация ССК 7 взрослых пациентов с лимфомой Ходжкина. Половые клетки пациентов были собраны и криоконсервированы перед началом лечения, затем трансплантированы в семявыносящие канальцы каждого пациента после лечения. О дальнейших результатах данных исследований не сообщалось [19, 20]. Это свидетельствует о том, что введение половых клеток в семявыносящие канальцы человека технически возможно, но производство сперматозоидов таким способом клинически недостаточно применимо.

При этом количество ССК уменьшается в процессе транспортировки, криоконсервации и дальнейшего размораживания. Что еще более важно, просто ауто трансплантация недостаточно безопасна, так как возможна контаминация этих гамет злокачественными клетками при реимплантации. Поэтому у культуры ССК есть преимущество. Они могут быть размножены *in vitro* и протестированы на генетические изменения, которые могли возникнуть в их геноме. Технология же сортировки клеток поможет ликвидировать возможные злокачественные клетки. К. Fujita и соавт. показали, что флуоресцентная сортировка клеток (fluorescence activated cell sorting) способствует удалению лейкозных клеток из тканей тестикул в целях исключения рецидива данного заболевания у мышей [21].

Различные генетические патологии приводят к нарушению процесса сперматогенеза, появлению дефектных сперматозоидов. В настоящее время развитие и постоянное совершенствование современных вспомогательных репродуктивных технологий (artificial reproductive technologies), например интрацитоплазматическая инъекция спермы (intracytoplasmic sperm injection, ICSI), экстракорпоральное оплодотворение

(*in vitro* fertilisation), предотвратили значительную долю случаев мужского бесплодия, которые были неизлечимы прежде.

С другой стороны, не было достигнуто практически никакого прогресса в основных методах лечения, которые способствовали восстановлению нарушенного сперматогенеза и увеличению уровня (индекса) пролиферации подвижных сперматозоидов в эякулятах пациентов. Знания о сперматогенезе человека ограничены в основном из-за отсутствия экспериментальных систем. Однако посредством процедуры экстракции спермы из ткани яичек (testicular sperm extraction, TESE) пациентов, страдающих азооспермией, ясно, что яички гетерогенны в зависимости от сегмента семенных канальцев с точки зрения стадии сперматогенеза. Даже когда большинство семявыносящих канальцев были лишены половых клеток, иногда небольшие очаги сперматогенеза все же обнаруживались. Эти наблюдения были зарегистрированы в случаях дефектов сперматогенеза при врожденных генетических формах патологии, таких как микроделеция хромосомы Y [22, 23], а также в случаях приобретенных дефектов, таких как ятрогенная азооспермия, после курса терапии злокачественных заболеваний [24–26].

Однако TESE, хотя и необходима для получения сперматозоидов в целях проведения процедуры ICSI у пациентов, страдающих азооспермией, не является терапевтическим средством, а следовательно, необходимы адекватные подходы к лечению андрологических заболеваний для того, чтобы индуцировать сперматогенез пациента. Проводимая в настоящее время предварительная гормональная терапия перед TESE показывает положительные результаты [27]. При этом образцы половых клеток, полученные в результате выполнения TESE, могут быть ценным источником для изучения механизмов сперматогенеза человека [28].

В 2011 г. группой исследователей во главе с Т. Ogawa была успешно продемонстрирована возможность экстракорпорального сперматогенеза у мышей при применении органной культуры в целях воссоздания микроокружения, подобного гистологическому строению тестикул, которое сочетает в себе компоненты, необходимые для нормального сперматогенеза, в том числе соматические клетки, такие как клетки Сертоли и перитубулярные миоидные клетки, которые образуют структуры семявыносящих канальцев [29, 30]. Это, безусловно, будет полезным методом для изучения органогенеза тестикул и сперматогенеза. Комбинация клеток из разных источников при участии не только половых клеток, но и различных типов соматических клеток может представлять интерес для реконструкции тестикул. Когда вспомогательные клетки станут доступны из линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток или других источников, фрагменты тестикулярной ткани могут быть восстановлены *in vitro*, что в будущем может сделать этот метод более целесообразным для практического применения в изучении сперматогенеза человека. Это даст возможность сохранить фертильность у пациентов препубертатного возраста.

Однако необходимо будет учитывать возможные генетические изменения на каждом этапе дифференцировки таких половых клеток в целях установления возможного развития патологии гаметогенеза. К настоящему времени недостаточно экспериментальных данных, указывающих на эпигенетические факторы, влияющие на половые клетки и интенсивность сперматогенеза. Исследования ССК человека необходимы для получения данных о мужской репродуктивной физиологии и патологии, а также для изучения молекулярных и клеточных механизмов идиопатических дефектов сперматогенеза. Основываясь на новой информации, можно будет создавать методы профилактики и лечения мужского бесплодия.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Райцина С.С. Сперматогенез и структурные основы его регуляции. М.: Наука, 1985. 207 с. [Raytsina S.S. The spermatogenesis and structural basis of its regulation. Moscow: Nauka, 1985. 207 p. (In Russ.)].
2. Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 1963;112:35–51.
3. Tegelenbosch R.A., de Rooij D.G. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* 1993;290:193–200.
4. Brinster R.L., Zimmermann J.W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(24):11298–302.
5. Ogawa T., Ohmura M., Tamura Y. et al. Derivation and morphological characterization of mouse spermatogonial stem cell lines. *Arch Histol Cytol* 2004;67(4):297–306.
6. Shinohara T., Inoue K., Ogonuki N. et al. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and *in vitro* microinsemination. *Hum Reprod* 2002;17(12):3039–45.
7. Dobrinski I., Avarbock M.R., Brinster R.L. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol Reprod* 1999;61(5):1331–9.
8. Meng X., Lindahl M., Hyvonen M.E. et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 2000;287(5457):1489–93.
9. Hamra F.K., Chapman K.M., Nguyen D.M. et al. Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(48):17430–5.
10. Kubota H., Wu X., Goodyear S.M. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor and endothelial cells promote self-renewal of rabbit germ cells with spermatogonial stem cell properties. *FASEB J* 2011;25(8):2604–14.
11. Kanatsu-Shinohara M., Muneto T., Lee J. et al. Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. *Biol Reprod* 2008;78(4):611–7.



12. Полякова М.В. Влияние условий культивирования на поддержание сперматогониев хряка *in vitro*. Автореф. дис.... канд. биол. наук. М., 2013. 27 с. [Poliakova M.V. Influence of culture conditions on the maintenance of boar spermatogonia *in vitro*. Abstract of the thesis ... of the candidate of biological. Moscow, 2013. 27 p. (In Russ.)].
13. Aponte P.M., Soda T., Teerds K.J. et al. Propagation of bovine spermatogonial stem cells *in vitro*. *Reproduction* 2008;136(5):543–57. DOI: 10.1530/REP-07-0419.
14. He Z., Kokkinaki M., Jiang J. et al. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biol Reprod* 2010;82(2):363–72.
15. Lass A., Akagbosu F., Brinsden P. Sperm banking and assisted reproduction treatment for couples following cancer treatment of the male partner. *Hum Reprod* 2001;7(4):370–7.
16. Chung K., Irani J., Knee G. et al. Sperm cryopreservation for male patients with cancer: an epidemiological analysis at the University of Pennsylvania. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 113 Suppl 1:S7–11.
17. Schlatt S., Foppiani L., Rolf C. et al. Germ cell transplantation into X-irradiated monkey testes. *Hum Reprod* 2002;17(1): 55–62.
18. Brook P.F., Radford J.A., Shalet S.M. Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. *Fertil Steril* 2001;75:269–74.
19. Radford J., Shalet S., Lieberman B. Fertility after treatment for cancer. Questions remain over ways of preserving ovarian and testicular tissue. *BMJ* 1999;319(7215):935–6.
20. Radford J. Restoration of fertility after treatment for cancer. *Horm Res* 2003; 59 Suppl 1:21–3.
21. Fujita K., Ohta H., Tsujimura A. et al. Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia. *J Clin Invest* 2005;115(7):1855–61.
22. Tsujimura A., Matsumiya K., Takao T. et al. Clinical analysis of patients with azoospermia factor deletions by microdissection testicular sperm extraction. *Int J Androl* 2004;27(2):76–81.
23. Choi J.M., Chung P., Veeck L. et al. AZF microdeletions of the Y chromosome and *in vitro* fertilization outcome. *Fertil Steril* 2004;81(2):337–41.
24. Sakamoto H., Oohta M., Inoue K. et al. Testicular sperm extraction in patients with persistent azoospermia after chemotherapy for testicular germ cell tumor. *Int J Urol* 2007;14:167–70.
25. Meseguer M., Garrido N., Remohi J. et al. Testicular sperm extraction (TESE) and ICSI in patients with permanent azoospermia after chemotherapy. *Hum Reprod* 2003;18(6):1281–5.
26. Damani M.N., Master V., Meng M.V. et al. Postchemotherapy ejaculatory azoospermia: fatherhood with sperm from testis tissue with intracytoplasmic sperm injection. *J Clin Oncol* 2002;20(4):930–6.
27. Shiraishi K., Ohmi C., Shimabukuro T., Matsuyama H. Human chorionic gonadotrophin treatment prior to microdissection testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2012;27(2):331–9. DOI: 10.1093/humrep/der404.
28. Shiraishi K., Matsuyama H. Local expression of epidermal growth factor-like factors in human testis and its role in spermatogenesis. *J Androl* 2012;33(1):66–73. DOI: 10.2164/jandrol. 110.011981.
29. Sato T., Katagiri K., Gohbara A. et al. *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 2011;471(7339):504–7. DOI: 10.1038/nature09850.
30. Sato T., Katagiri K., Yokonishi T. et al. *In vitro* production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nat Commun* 2011;2:472. DOI: 10.1038/ncomms1478.