

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ИЗУЧЕНИЯ МУЖСКОЙ ИНФЕРТИЛЬНОСТИ IN VIVO И IN VITRO

Голубенцева Ю.В., Протасова Г.А., Краснякова Е.А.,

Кириленко П.С., Попов В.Б.

Федеральное государственное унитарное предприятие

«Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека»

Федерального медико-биологического агентства, 188663, Ленинградская обл.,

yu.golubentseva@mail.ru

Резюме. Проведено экспериментальное изучение проблем мужской репродукции, в частности, мужского бесплодия, и поиска подходов для коррекции, индуцированных токсикантами, патологических процессов в сперматогенном эпителии семенников мыши. *Цель работы* - создание двух экспериментальных моделей 1) мужской индуцированной инфертильности *in vivo* - на примере действия антрациклинового антибиотика доксорубицина, применяемого при химиотерапии ряда раковых заболеваний и являющегося мощным цитотоксическим агентом и 2) модели развития и созревания *in vitro* сперматогенных клеток от сперматогоний до зрелых сперматозоидов. Обе модели могут быть использованы в качестве объектов морфофункциональных исследований роли токсикантов в развитии инфертильности, как источники возможного пула донорских клеток для компенсации (коррекции) токсических поражений, как совершенствование методов тестирования химических соединений на репротоксичность. В экспериментах по созданию модели мужской индуцированной инфертильности *in vivo* проведено однократное введение (в/в, в/б) доксорубицина мышам C57BL/6 или (C57BL/6×CBA) F1 в дозах 6 или 10 мг/кг. Гистологический анализ срезов семенников через 9 дней после воздействия выявил отсутствие в канальцах семенников сперматогоний, увеличение числа пикнотических клеток, микроядра, вакуолизацию цитоплазмы клеток Сертоли. К 18 суткам наблюдалось отсутствие сперматогоний и сперматоцитов, была отмечена гиперплазия клеток Сертоли. К 27-36 суткам действие препарата привело к полному опустошению семенных канальцев, за исключением клеток Сертоли. Иммуногистохимическое окрашивание препаратов на 36 сутки на маркер PLZF подтвердил наличие сперматогониальных стволовых клеток. Оценка регенерационного потенциала семенников показала появление на 72 сутки сперматогоний и сперматоцитов в части канальцев, по всей видимости, за счет активации сперматогенных стволовых клеток. Иммунофлуоресцентный анализ причин гибели клеток с помощью биомаркера γ H2AX выявил повреждение ДНК клеток суспензии семенников с увеличением доли поврежденных

ядер на 1-27 сутки. Анализ численности и подвижности сперматозоидов эпидидимиса в период 9-36 суток после воздействия выявил их резкое уменьшение к 36 суткам (в 3,9 раза по сравнению с контролем), снижение подвижных форм до 11,8% против 79,4% в контроле ($p < 0.001$). Кроме того, несколько возросло количество патологических форм сперматозоидов. Результатом работы явилось создание двух моделей для изучения индуцированной мужской infertility. Их создание направлено на развитие способов экспериментальной коррекции (восстановления) семенников с нарушенным воспроизводством сперматогенных клеток за счет донорских (аутологичных, аллогенных) трансплантаций материалов, полученных в экспериментах *in vivo* и *in vitro*.

Ключевые слова: индукция мужской infertility; доксорубин; коррекция; культивирование сперматогенных клеток

EXPERIMENTAL MODELS FOR THE STUDY OF MALE INFERTILITY IN VIVO AND IN VITRO

Golubentseva Yu.V., Protasova G.A., Krasnyakova E.A., Kirilenko P.S., Popov V.B.

Federal State Unitary Enterprise "Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology" of the Federal Medical and Biological Agency, 188663, Leningrad Region, Vsevolozhsky District, Kuzmolovsky, Kapitolovo station, korp. № 93

Abstract. An experimental study of the problems of male reproduction, in particular, male infertility, and the search for approaches for the correction of pathological processes induced by toxicants in the spermatogenic epithelium of mouse testes were carried out. The *aim* of the work is to create two experimental models 1) male induced infertility *in vivo* - on the example of the action of the anthracycline antibiotic doxorubicin, which is used in the chemotherapy of a number of cancers and is a powerful cytotoxic agent, and 2) an *in vitro* model of development and maturation of spermatogenic cells from spermatogonia to mature spermatozoa. Both models can be used as objects of morphological and functional studies of the role of toxicants in the development of infertility, as sources of a possible pool of donor cells for compensation (correction) of toxic lesions, as an improvement in methods for testing chemical compounds for reprotoxicity. In experiments to create a model of male induced infertility *in vivo*, a single administration (*i.v.*, *i.p.*) of doxorubicin to C57BL/6 or (C57BL/6×CBA) F1 mice was performed at doses of 6 or 10 mg/kg. Histological analysis of sections of the testes 9 days after exposure revealed the absence of spermatogonia in the tubules of the testes, an increase in the number of pycnotic cells, micronuclei, and vacuolization of the cytoplasm of Sertoli cells. By day 18, the absence of spermatogonia and

spermatocytes was observed, hyperplasia of Sertoli cells was noted. By 27-36 days, the action of the drug led to the complete devastation of the seminiferous tubules, with the exception of Sertoli cells. Immunohistochemical staining of preparations on day 36 for the PLZF marker confirmed the presence of spermatogonial stem cells. Evaluation of the regenerative potential of the testes showed the appearance of spermatogonia and spermatocytes in part of the tubules on the 72nd day, most likely due to the activation of spermatogenic stem cells. Immunofluorescent analysis of the causes of cell death using the γ H2AX biomarker revealed damage to the DNA of the testis suspension cells with an increase in the proportion of damaged nuclei on days 1-27. Analysis of the number and motility of epididymis spermatozoa in the period of 9-36 days after exposure revealed their sharp decrease by 36 days (by 3.9 times compared with control), a decrease in mobile forms to 11.8% versus 79.4% in control ($p < 0.001$). In addition, the number of pathological forms of spermatozoa has slightly increased. The result of the work was the creation of two models for the study of induced male infertility. Their creation is aimed at developing methods for experimental correction (restoration) of testes with impaired reproduction of spermatogenic cells due to donor (autologous, allogeneic) transplantation of materials obtained in experiments in vivo and in vitro.

Keywords: induction of male infertility; doxorubicin; correction; cultivation of spermatogenic cells

Введение. Проблемы демографической ситуации в стране во многом связаны со снижением рождаемости, одной из причин которой является рост количества бесплодных пар: от 9% до 16% в мире и 17-20 % в России [1, 2]. При этом, мужская infertility является причиной 40-50 % всех случаев бесплодия [3]. В значительной мере наиболее важными показателями мужского репродуктивного здоровья являются количественные, и качественные характеристики семени – сперматозоидов, значения которых претерпели изменения в последние десятилетия. Так, по статистическим данным Н. Levine et al [4] численность сперматозоидов за последние 40 лет снижалась в среднем на 1,4% ежегодно: в 1973 г она составляла 99,0 млн/мл и 47,1 млн/мл – в 2011 г, т.е. снизилась на 52,4%. Снижение референтных значений численности сперматозоидов произошло и по данным ВОЗ [5]. Отмечено также изменение в течение 1987-2010 г. подвижности и морфологии сперматозоидов в норме: от 60% и, соответственно, 50% в 1987 г. до 50% и 4% в 2010 г. [6].

Мужское бесплодие является многофакторным и может быть результатом различных расстройств [2, 7, 8], среди которых:

- врожденные и генетические нарушения;
- инфекции и воспаления органов половой системы;

- физические, химические и другие факторы (медикаменты, алкоголь, наркотики и т.д.), отрицательно влияющие на сперматогенез;

- травмы половой системы;

- эндокринные расстройства и др.

Нарушение мужской фертильности (вплоть до индукции бесплодия) нередко обусловлено действием факторов окружающей среды (радиация, металлы, химио- и лекарственные препараты и т.п.), влиянием многих химиотерапевтических агентов, используемых при лечении онкозаболеваний [2, 6, 9, 10-13 и др.]. Нарушение фертильности химиотерапевтическими препаратами серьезная проблема, требующая, кроме всего, поиска новых способов терапии (коррекции, восстановления) повреждений. Разработки таких подходов ведутся достаточно активно как в экспериментах на животных (*in vivo*, *ex vivo*), так и *in vitro*, затрагивая самые разные этапы гаметогенеза [14, 15, 16].

Для понимания детальных механизмов гаметотоксических эффектов тех или иных повреждающих факторов, в том числе оказывающих сочетанное повреждающее действие на гонады и гаметы, приобретает актуальность создание экспериментальных моделей сперматогенеза и индуцированной инфертильности как *in vivo*, так и *in vitro*. Регенеративный потенциал герминативного эпителия, являющийся основой для восстановительных процессов, еще до конца не изучен и представляется перспективным инструментом исследований и создания моделей, что необходимо для апробации новых экспериментальных подходов в регенеративной медицине, направленной на лечение мужского бесплодия, а также оценки иницирующих его репротоксикантов. В частности, необходима модель индуцированной инфертильности на животных, что даст возможность получать стабильные и воспроизводимые результаты при различных модификациях экспериментов, в частности, при сочетании с экспериментами *in vitro*. Создание системы культивирования сперматогенных клеток с конечным получением сперматозоидов рассматривается в настоящее время как мощный инструмент в этом направлении [17, 18]. Эксперименты *in vitro* по развитию сперматогенных клеток необходимы как самостоятельный подход в изучении механизмов нормального и патологического сперматогенеза, так и как модель выявления наиболее чувствительных к конкретному воздействию этапов сперматогенеза, как инструмент вспомогательных репродуктивных технологий при трансплантации половых клеток в семенники животных [15, 16, 19]. Кроме того, ряд исследователей считают, что культуры сперматогенных клеток могут служить в качестве скринингового инструмента и альтернативы чрезвычайно дорогим тестам на животных по оценке влияния токсикантов на спермато- и спермиогенез [17, 20, 21].

Таким образом, настоящая работа направлена на создание двух моделей для изучения индуцированной химическим воздействием инфертильности у мышей. Одна модель создана на мышах при воздействии антрациклинового антибиотика доксорубина (ДОКС), применяемого при химиотерапии ряда раковых заболеваний и являющегося мощным цитотоксическим агентом, репротоксикантом, активно повреждающим женский и мужской гаметогенез, а также развитие эмбрионов [22, 23, 24, 25]. Основа другой модели – культура *in vitro* сперматогенных клеток мыши, как объект быстрой визуальной оценки особенностей повреждающего гаметотоксического действия доксорубина и как потенциальный ресурс для направленных восстановительных процессов (коррекции) в развитии половых клеток.

Цель: создание двух экспериментальных моделей – мужской индуцированной инфертильности *in vivo* и модели развития и созревания *in vitro* сперматогенных клеток от сперматогоний до зрелых сперматозоидов:

как 1) объектов морфофункциональных исследований роли токсикантов в развитии инфертильности, как 2) возможного пула донорских клеток для компенсации (коррекции) токсических поражений, как 3) совершенствование методов тестирования химических соединений на репротоксичность.

Материалы и методы. Для создания экспериментальной модели *in vivo* использовали половозрелых СПФ самцов, полученных из питомника «Пушино» (г. Пушино, Московская область). Для второй модели использовали новорожденных (7-7,5 день после родов) самцов мышей, полученных скрещиванием гибридов F1 C57BL/6×CBA. Содержание и кормление лабораторных животных производилось в соответствии с Правилами лабораторной практики в Российской Федерации, утвержденными приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003 № 267. Есть разрешение этической комиссии.

Мужская инфертильность, индуцированная доксорубином *in vivo*. Для работы были сформированы группы по 5 (половозрелых) самцов каждого вида мышей (линии C57BL/6, мышей гибридов F1 C57BL/6×CBA), которым однократно внутривенно (в/в) и внутрибрюшинно (в/б) вводили доксорубин (ДОКС) в дозе 6 мг/кг и 10 мг/кг. Животных через 9, 18, 27, 36 и 72 суток после воздействия подвергали дислокации шейных позвонков. Для патоморфологического анализа у животных иссекали семенники, фиксировали в растворе Буэна, проводку осуществляли в гистологическом процессоре замкнутого цикла Tissue-Tek VIP (Sakura, Япония), заливку в парафин проводили на станции парафиновой заливки Tissue - Tek TEC (Sakura, Япония), срезы толщиной 4 мкм изготавливали на ротационном микротоме Accu - Cut SRM 200 (Sakura, Япония). Гистологические срезы окрашивали гематоксилин–эозином и анализировали с помощью микроскопа Axioskop 40

(Carl Zeiss, Германия) с цветной цифровой фотокамерой ProgRes CFscan (Carl Zeiss, Германия),

Для гистохимического анализа (ИГХ) семенники фиксировали в 10% нейтрально-забуференном формалине 1 сутки. Парафиновые срезы (4 мкм) обрабатывали иммуногистохимическим методом для выявления ядерного маркера PLZF с использованием мышинных моноклональных антител anti-PLZF. Иммуногистохимическое окрашивание срезов проводили согласно стандартному протоколу фирмы производителя UltraVision Quanto (Thermo Scientific, США), срезы дополнительно окрашивали гематоксилином Эрлиха и после дегидратации заключали в гель Биомаунт (Биовитрум, Россия) под покровные стекла.

Оценку динамики повреждения ДНК клеток сперматогенного эпителия проводили с использованием биомаркера γ H2AX на 1, 9, 18, 27 сутки после воздействия ДОКС. Клетки семенников фиксировали 4%-ным раствором формалина в PBS (10 мин) с последующей инкубацией (5 мин) в охлажденном 70%-ном этаноле. Количественный и качественный иммунофлуоресцентный анализ клеток проводили с использованием антител анти- γ H2AX. Препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе Zeiss Imager A2 (Германия) с использованием фильтров DAPI, Green, при общем увеличении $\times 100$ – $\times 400$. На каждом препарате анализировали 300 клеток.

Оценку жизнеспособности клеток семенников проводили окрашиванием 0,4%-ным трипановым синим. Подсчет числа живых клеток проводился в автоматическом счетчике клеток Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, США).

Оценку функционального состояния эпидидимисов мыши исследовали на 9-142 сутки после воздействия препаратом. Оценивали общее количество сперматозоидов, а также подвижные и неподвижные формы. Оценку фертильности самцов проводили путем спаривания интактных самок с подопытными самцами на 18-142 сутки.

Оценка патологических форм сперматозоидов. Для анализа патологических форм сперматозоидов из их суспензии приготавливали мазки на предметных стеклах, подсушивали на воздухе, фиксировали в 96⁰ этаноле и окрашивали азур-эозином по Романовскому. Количество и характер аномальных форм оценивали при просмотре не менее 200 сперматозоидов, используя классификацию Wygrobek & Bruce [26, 27]. В соответствии с ней, выявляли различные формы головок сперматозоидов, в частности:

тип А – головка имеет правильную ассиметричную, серповидную форму – норма;

тип В – крюк, патология головки имеет неправильную серповидную форму с широким основанием и более вытянутым загнутым крючком;

тип С – бананоподобная головка, патология головки;

тип D – аморфная, патология головки с сильно деформированной, лишенной правильной формы. С полным отсутствием либо неправильным расположением и строением крючка;

тип E – сложение на себя. Хвост (жгутик) сперматозоида закручен по спирали либо хаотично, может перекрывать головку);

тип K – двойная головка, сперматозоиды имеют один жгутик и шейку, но при этом имеет две головки.

Культивирование сперматогенных клеток *in vitro*. Для культивирования сперматогенных клеток использовали семенники мышей на 7 сутки после рождения, полученных от скрещивания самок и самцов гибридов C57Bl/6×CBA.

Выделение клеток семенника проводили в соответствии с методиками [28,29,30] в модификации. Семенники извлекали, обрабатывали растворами коллагеназы IV (0,7 мг/мл) и трипсина (0,125%). Суспензию клеток промывали с 10% сывороткой в растворе Хэнкса, центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин. Осадок разводили ростовой средой и высевали в чашках Петри в концентрации $4 \cdot 10^5$ кл/см². В качестве основной ростовой среды использовали DMEM с высоким содержанием глюкозы 4,5 мг/л (Биолот, Россия), с 20 % содержанием фетальной сыворотки плодов коровы (Gibco, США), 1% глютамина (Gibco, США), 1% антибиотика (Gibco, США), 1% MEM (Gibco, США). Культивирование проводили в инкубаторе при 37°C и 5% содержанием CO₂. Полученную клеточную суспензию высевали на чашки Петри, покрытые 0,1% раствором желатина. Через 24 часа культуру клеток промывали дважды раствором DPBS. Среду меняли каждые 3-4 дня. Через неделю культивирования ростовую среду заменяли на среду для дифференцировки сперматогониев DMEM (глюкоза 4,5 мг/л), с 5% содержанием фетальной сыворотки коров и добавлением ростовых факторов EGF, bFGF, BMP-4, GDNF, pituitary extract bovine, тестостерона.

Морфологическую оценку свежевыделенной популяции сперматогенного эпителия мыши проводили с использованием фазово-контрастного микроскопа Eclipse Ti-S (Nicon, Япония). Для получения постоянных препаратов клетки фиксировали в растворе метанол-уксус (3:1) и окрашивали по Романовскому-Гимза. Клетки Сертоли окрашивали жирным красным O (15 мин). Для иммунофлуоресцентного и иммуногистохимического анализа использовали поликлональные кроличьи антитела ZBTB16 (rabbit polyclonal antibody ZBTB16 (PLZF), Sigma-Aldrich, 1:200), поликлональные кроличьи антитела против мышинных NANOG (polyclonal rabbit antibody, Abcam, 1:100), поликлональные кроличьи антитела против мышинных ACROSIN (rabbit polyclonal anti-acrosin antibody, Abcam, 1:1000), лектин конъюгированный с флуорохромом Alexa 568 (Alexa 568-conjugated peanut agglutinin (PNA),

Molecular probe, 1:600). В качестве вторичных антител использовали козы антимышинные IgG, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 488, козы антикроличьи IgG Alexa Fluor 594. Ядра докрашивали ядерным флуоресцентным красителем DAPI. Препараты анализировали на микроскопе Zeiss Imager A2 с флуоресцентным блоком Axio X-Cite series 120 Q (Германия) при общем увеличении $\times 100$ – $\times 400$.

Статистическую обработку материала производили, используя t-критерий Стьюдента в программе Prizm 5. Различия между оцениваемыми данными считались достоверными при $P < 0,05$.

Результаты исследования. Моделирование инфертильности на мышах. Самцам мыши однократно в/в или в/б вводили доксорубин в дозах 6 или 10 мг/кг. Микроскопический анализ гистологических срезов семенников, приготовленных в различные сроки (9-72 сутки) после воздействия, выявил через 9 дней отсутствие сперматогоний, увеличение числа пикнотических клеток, микроядра, вакуолизацию цитоплазмы клеток Сертоли (рисунок 1Б). В контроле (рисунок 1А) присутствуют все типы клеток сперматогенного эпителия.

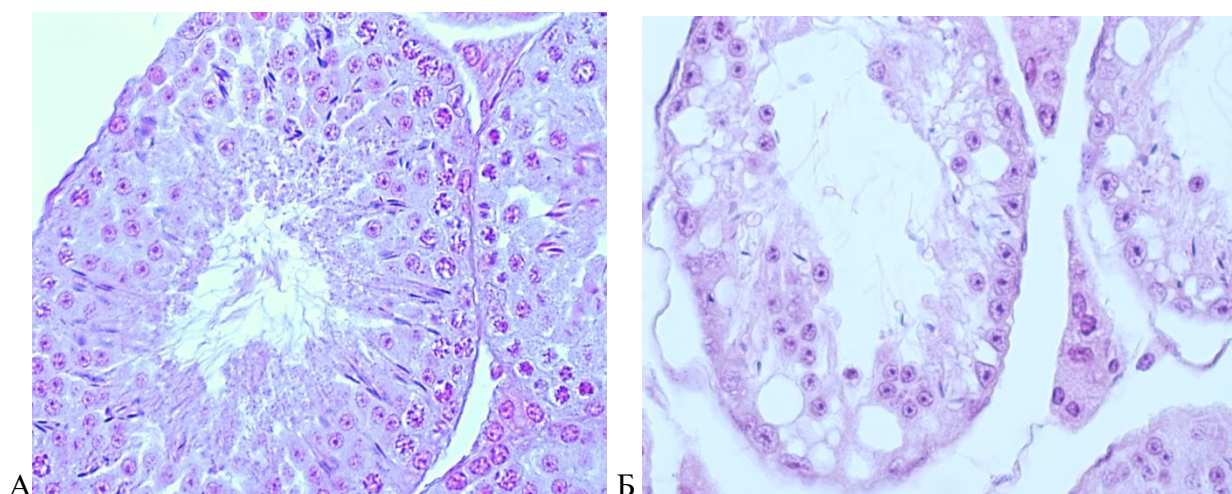


Рисунок 1 – Гистологический срез семенника мыши линии C57BL/6, фиксация Буэн, окраска гематоксилин-эозин. А – контроль, ув $\times 400$. Б – доксорубин, 10 мг/кг, 9 сутки.

Дезорганизация сперматогенного эпителия, отсутствие сперматогоний, пикнозы, вакуоли в цитоплазме клеток Сертоли, ув $\times 650$

На 18 сутки после воздействия ДОКС в семенных канальцах отмечено полное отсутствие как сперматогоний, так и мейотических сперматоцитов. К 27 суткам после введения наблюдали нарастание деструктивных изменений, опустошение части канальцев, в других отмечены лишь сперматиды удлинённой формы и сперматозоиды, помимо этого наблюдалась гиперплазия клеток Лейдига (рисунок 2А и Б).

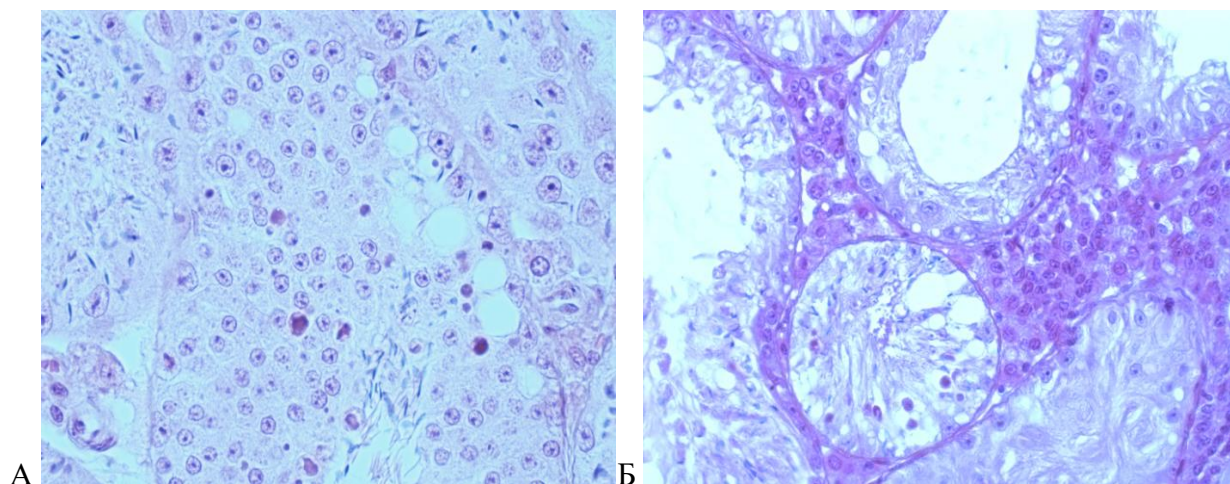


Рисунок 2 – Семенник мыши линии C57BL/6, доксорубицин, 10 мг/кг, фиксация Буэн, окрашивание гематоксилин – эозин. А. – 18 сут, отсутствие сперматогоний, сперматоцитов, пикнозы, вакуолизация цитоплазмы клеток Сертоли, ув x650. Б. – 27 сутки, отсутствие сперматогоний, сперматоцитов, вакуолизация цитоплазмы клеток Сертоли, гиперплазия клеток Лейдига, ув. x400

Дезорганизация семенного эпителия и полное опустошение семенных канальцев отмечено на 36 сутки после однократного введения ДОКС. Исключение составили клетки Сертоли и единичные клетки, расположенные на базальной мембране, напоминающие по морфологии стволовые сперматогенные клетки (ССК) (рисунок 3А). Иммуногистохимический анализ препаратов с использованием маркера стволовых сперматогенных клеток PLZF, подтвердил их присутствие на срезах этого срока (рисунок 3Б). PLZF (promyelocytic leukemia zinc-finger) – транскрипционный фактор, экспрессирующийся в недифференцированных сперматогониях семенника, которые относят к сперматогенным стволовым клеткам (As, ССК) [15]. Их присутствие позволяет предполагать регенерационный потенциал семенного эпителия после воздействия ДОКС.

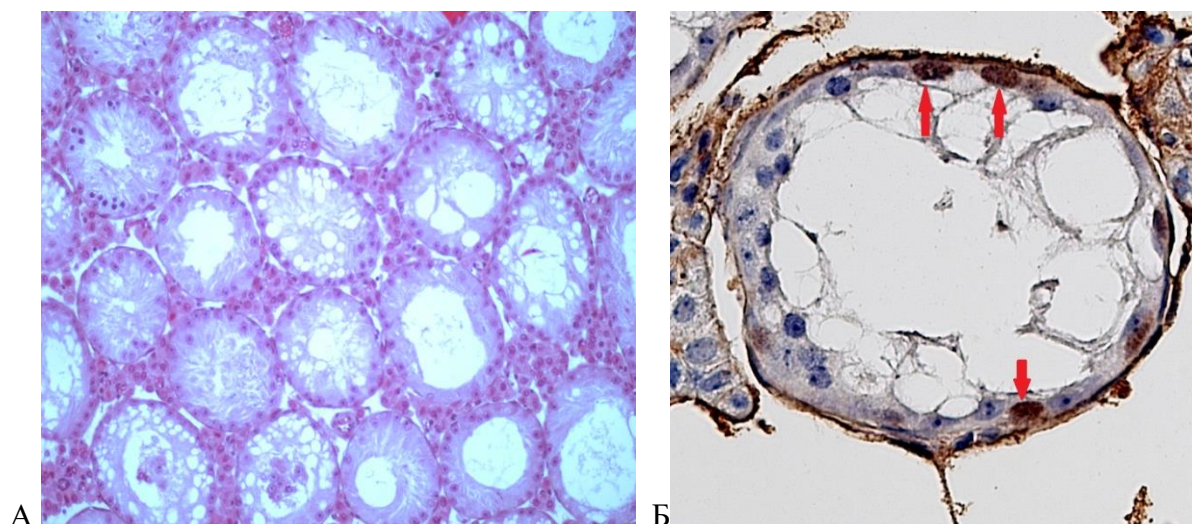


Рисунок 3 – Семенник мыши линии C57BL/6, ДОКС, 10 мг/кг 36 сут. А. Полное опустошение семенных канальцев. Вакуолизация цитоплазмы клеток Сертоли. Гиперплазия клеток Лейдига. Окрашивание гематоксилин-эозин, ув x200. Б. Иммуногистохимический анализ семенника мыши на маркер PLZF, Коричневые окрашенные ядра по периферии канальца (красные стрелки) – недифференцированные сперматогонии (ССК), ув x400

Оценка регенерационного потенциала семенников после воздействия. На 35-36 дни заканчиваются 4 цикла развития семенного эпителия для продукции сперматозоидов мыши [31]. Результаты показывают, что к этому сроку после воздействия ДОКС семенник становится полностью опустошенным, продукция сперматозоидов и, в целом, сперматогенных клеток прекращена. Однако, присутствие клеток Сертоли и СКК позволяют предположить возможное восстановление семенного эпителия. В связи с этим, мы продолжили наблюдение за оставшимися в живых самцами мышей вплоть до 142 дня после воздействия, однако, заметных изменений в структуре клеток канальцев, в сравнении с 36 днем, найдено не было. В связи с этим, снизив дозу ДОКС до 6 мг/кг и убедившись, что она также вызывает полное опустошение семенных канальцев (рисунок 4А), оценили регенерационный потенциал и в этом эксперименте. На 73 сутки после воздействия в канальцах отмечено появление сперматогоний и сперматоцитов, что свидетельствует о начале восстановительных процессов. Насколько полным может быть это восстановление, покажут дальнейшие исследования.

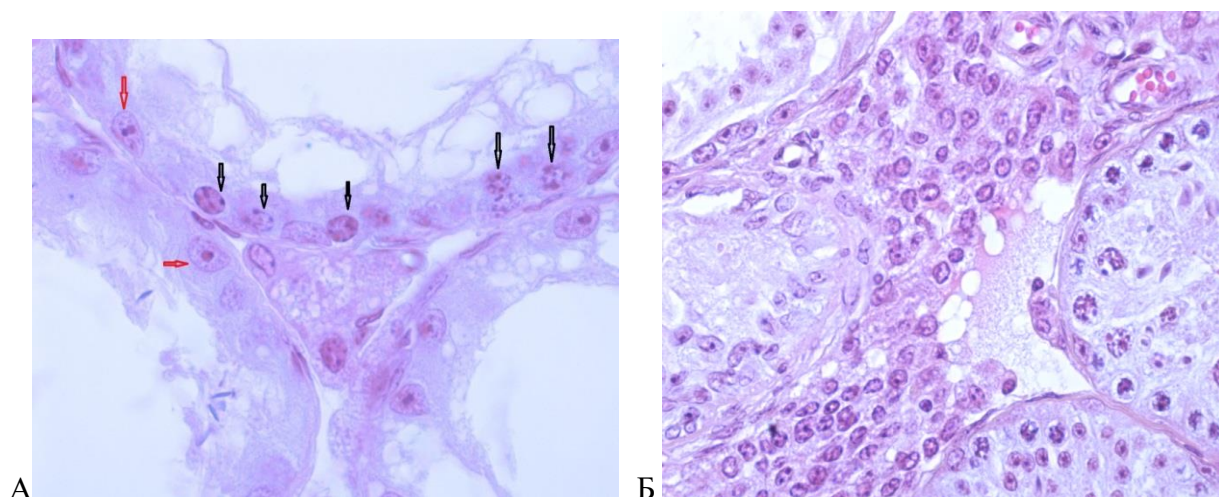


Рисунок 4 – Семенник мыши линии C57BL/6, ДОКС 6 мг/кг, фиксация Буэн, окрашивание гематоксилин-эозин. А. 36 сутки после воздействия. Атрофия семенника. Черными стрелками обозначены единичные клетки, возможно ССК в семенном канальце, красные стрелки – клетки Сертоли, ув x1000. Б. 73 сутки. Гиперплазия клеток Лейдига, сперматогонии и сперматоциты в семенных канальцах, ув x650

Оценка гибели клеток в суспензии канальцев семенников мыши после воздействия. Динамика гибели клеток после воздействия нарастала от незначительной (9 сутки), до выраженной (27 и 36 сутки, уровень различий с контролем $p < 0.001$) (таблица 1). Среди живых клеток ССК, клетки Сертоли и возможно клетки Лейдига.

Таблица 1.

Гибель клеток в суспензии канальцев семенников (А) и (Б) сперматозоидов в эпидидимисе мыши после воздействия ДОКС в дозе 6 мг/кг (в %)

Контроль $X \pm m_x$	9 сутки $X \pm m_x$	18 сутки $X \pm m_x$	27 сутки $X \pm m_x$	36 сутки $X \pm m_x$
А. Гибель клеток в суспензии канальцев семенников, %				
$13,7 \pm 4,9$	$15,9 \pm 2,1$	-	$44,8 \pm 6,5^{**}$	$57,8 \pm 2,8^{***}$
Б. Количество неподвижных сперматозоидов (гибель) в эпидидимисе мыши, %				
$20,6 \pm 0,4$	$24,2 \pm 0,4$	$39,7 \pm 1,5^{***}$	$71,9 \pm 0,5^{***}$	$83,0 \pm 1,4^{***}$

Примечания: *, **, *** - уровни достоверности отличий от контроля, соответственно, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$. $X \pm m_x$ – среднее значение $\pm$ ошибка среднего

Оценка повреждений ДНК в клетках сперматогенного эпителия после воздействия. Иммунофлуоресцентный анализ повреждения ДНК клеток суспензии семенников проводили

с использованием биомаркера двойных разрывов ДНК (γ H2AX). По паттерну распределения зеленого сигнала были выявлены следующие группы клеток: 1) клетки с мелкими единичными фокусами, 2) клетки с большими фокусами – очагами, 3) клетки с большим количеством мелких (точечных) фокусов, 4) половые пузырьки сперматоцитов, 5) выраженное гомогенное окрашивание всей клетки (пан-окрашивание) или части клетки, 6) периферийное кольцо – окрашивание по периферии ядер клеток (рисунок 5). Через сутки после воздействия ДОКС в клетках сперматогенного эпителия мыши линии C57Bl/6 доля поврежденных ядер достоверно увеличивалась, выявлялось диффузное окрашивание ядер сперматогоний и удлинённых сперматид, окрашивание полового пузырька сперматоцитов, периферийное кольцо сперматогоний. К 9 суткам отмечено увеличение числа поврежденных ядер по биомаркеру γ H2AX, были выявлены следующие γ H2AX-положительные клетки: окрашивание полового пузырька сперматоцитов, диффузное окрашивание удлинённых сперматид, пан-окрашивание - в единичных клетках. К 18 суткам отмечали усиление эффекта после воздействия ДОКС, доля поврежденных ядер достоверно увеличивалась и к 27 суткам достигла максимального значения ($p<0,01$) (таблица 2). По характеру повреждения были обнаружены следующие типы клеток: с диффузным окрашиванием ядер, периферийным кольцом, а также круглые сперматиды с единичными локусами.

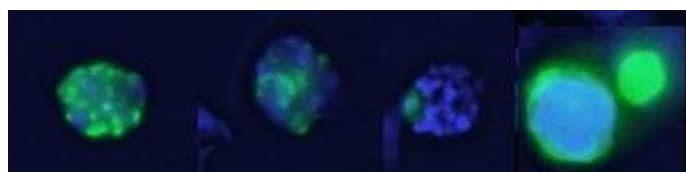


Рисунок 5 – Иммунофлуоресцентный анализ, характер и степень распределения фокусов γ H2AX в клетках канальцев семенника мыши линии C57Bl/6 (зеленый сигнал), ядра докрашены DAPI (синий), ув. x400

Таблица 2.

Количественная оценка повреждений ДНК клеток сперматогенного эпителия по биомаркеру γ H2AX (двунитевые разрывы) и живых клеток суспензии семенников мышей инбредной линии C57Bl/6

Сутки после воздействия доксорубина	А. Количество поврежденных ядер по маркеру γ H2AX	Б. Количество живых клеток в суспензии
Контроль, $X \pm m_x$	$7,7 \pm 1,0$ (7,5 %)	$86,3 \pm 4,2$
1 сутки, $X \pm m_x$	$11,3 \pm 0,9^*$ (11,1 %)	-

9 сутки, $X \pm m_x$	11,4 $\pm$ 1,7 (11,1 %)	84,1 $\pm$ 2,1
18 сутки, $X \pm m_x$	14,2 $\pm$ 0,0* (14 %)	-
27 сутки, $X \pm m_x$	30,0 $\pm$ 2,4 (28,6%**)	55,2 $\pm$ 6,5**
36 сутки, $X \pm m_x$	-	42,2 $\pm$ 2,8***

Примечания: *, **, *** - уровни достоверности отличий от контроля, соответственно, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$

Оценка функционального состояния сперматозоидов. Оценку функционального состояния сперматозоидов эпидидимисов проводили их подсчетом в суспензии в различные сроки после воздействия и с использованием флуоресцентного окрашивания (таблица 3, рисунок 6). Методика окрашивания флуоресцентными красителями дигидроэтидием и SYTOX Green позволяет быстро определять соотношение подвижных (живых) и неподвижных (погибших) сперматозоидов. Анализ численности и подвижности сперматозоидов эпидидимиса в период 9-36 суток после воздействия выявил их резкое уменьшение к 36 суткам (в 3,9 раза по сравнению с контролем) и снижение подвижных до 11,8% против 79,4% в контроле (таблица 3).

Таблица 3.

**Численность подвижных (живых) сперматозоидов в эпидидимисе мыши после
однократного введения ДОКС в дозе 6 мг/кг**

	Общее количество сперматозоидов (сперм/мл)	Количество подвижных сперматозоидов (в %)	спаривание	Оплодотворение In vitro
Контроль, $X \pm m_x$	9,9 x 10 ⁶	77,0 $\pm$ 2,2	12 ♀♀ спарено 12 беременны живых плодов 8,6 /♀	38 ооцитов 37 оплодотворены, развитие до бластоцисты
9 сутки, $X \pm m_x$	10,6 x 10 ⁶	75,8 $\pm$ 0,4	НД	18 ооцитов 9 оплодотворено, бластоцист – 7
18 сутки, $X \pm m_x$	12 x 10 ⁶	50,3 $\pm$ 1,5**	4 беременн. ♀♀, живых	41 ооцит 12 оплодотворено

			плодов- 0	остановились на стадиях дробления
27 сутки, $X \pm m_x$	$6,4 \times 10^6$	$28,6 \pm 0,6^{***}$	1 из 6 ♀♀ беременна, 7 живых плодов	НД
36-39 сутки, $X \pm m_x$	$8,0 \times 10^6$	$23,4 \pm 4,8^{***}$	беременных ♀♀ нет	17 ооцитов, оплодотворения нет
72 сутки, $X \pm m_x$	$2,1-7,8 \times 10^6$	0	беременных ♀♀ нет	Нет оплодотворения
142 сутки, $X \pm m_x$	$3,4-4,5 \times 10^5$	$88,2-95,6^{***}$	беременных ♀♀ нет	Нет оплодотворения

Примечание: *, **, *** - уровни достоверности отличий от контроля, соответственно, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$. НД – нет данных

Для оценки фертильности самцов проводили их спаривание с контрольными самками, а также эксперименты по оценке оплодотворяющей способности эпидидимальных сперматозоидов в те или иные сроки после воздействия. Спаривание подопытных самцов в различные сроки после воздействия, как правило, не приводило к беременности самок. Единственная беременность (27 с) является, скорее всего, техническим сбоем эксперимента. Результаты свидетельствуют о наступлении стерильности самцов через 18 суток после воздействия. Аналогичные результаты получены и в экспериментах по оплодотворению *in vitro* сперматозоидами подопытных самцов (таблица 3).

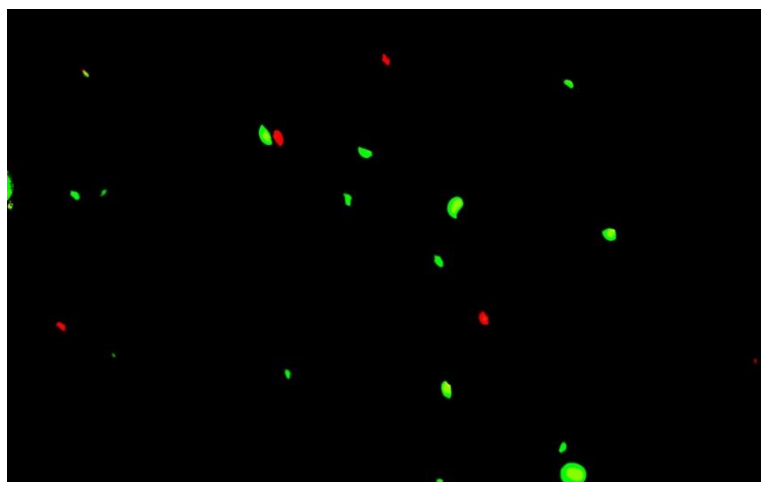


Рисунок 6 – Оценка жизнеспособности сперматозоидов мыши после воздействия.

Иммунофлуоресцентное окрашивание эпидидимальных сперматозоидов мыши C57Bl/CBA

на 27 день после воздействия ДОКС в дозе 10 мг/кг. Сперматозоиды окрашены флуоресцентным красителем дигидроэтидием и SYTOX Green. Неподвижные сперматозоиды окрашены зеленым, живые – красным цветом, ув. х400

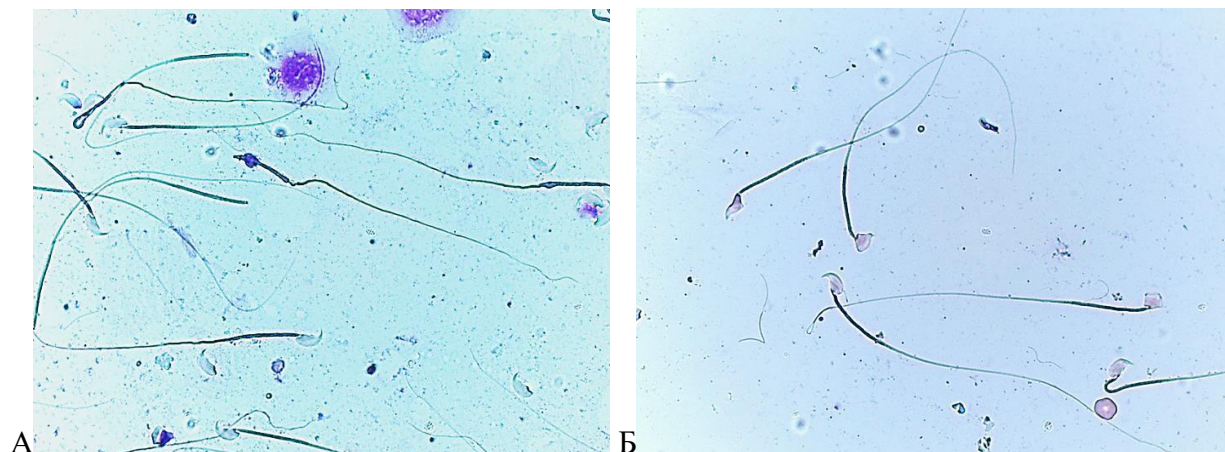
Оценка патологических форм сперматозоидов. Практически все патологические формы сперматозоидов встречались как в контроле, так и в эксперименте. Здесь мы отметим только те формы, которые превышали контрольный уровень или явились новыми формами (таблица 4, рисунок 7).

Таблица 4.

Уровни патологических форм сперматозоидов в контроле и в различные сроки после воздействия ДОКС

	Контроль	9 сут	18 сут	27 сут	36 сут
Всего	14,5 ± 0,5	63± 13,0*	51± 16,5*		
Тип В	3,5± 1,5	32± 4,0	23± 3,0		
Тип С	5,0 ± 1,8	13,5 ± 2,4*			
Тип D	26,0 ± 6,1				32,8 ± 5,2
Тип Е	0,5 ± 0,5			10,3 ± 1,4*	25,0± 1,4**
Тип К	-	-	-	единично	единично

Примечание: *, ** - уровни достоверности отличий от контроля, соответственно, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$.



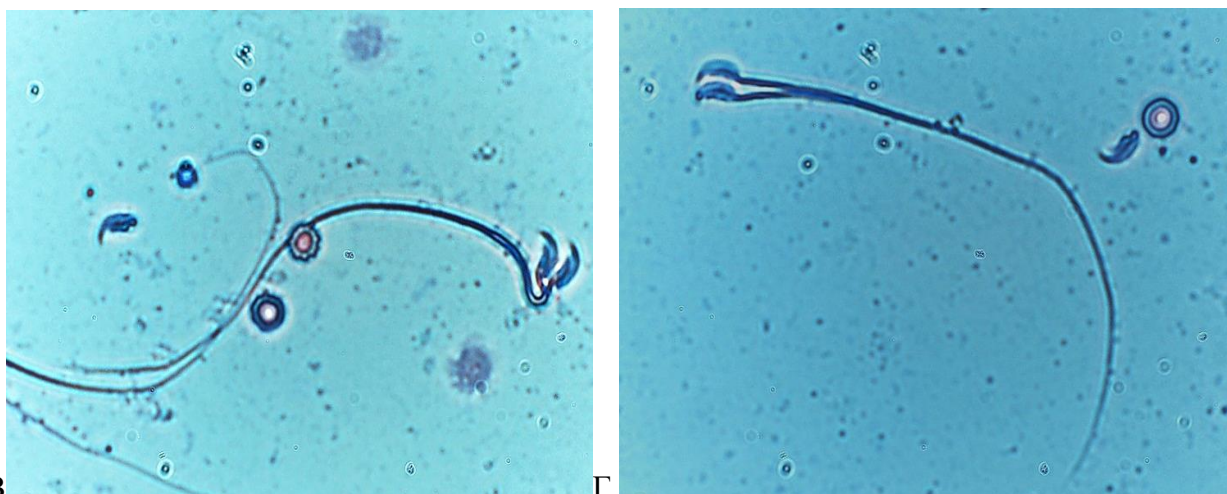


Рисунок 7 – Аномальные формы сперматозоидов, индуцированные действием ДОКС. А, Б – Аморфная головка (тип D), ув. x400; В, Г – Двойная головка (тип К). Мышь С57BL/6, фиксатор 96% этиловый спирт, окраска по Романовскому –Гимза, ув. x100

На 72 и 142 сутки после воздействия ДОКС в дозе 10 мг/кг спаривание подопытных самцов с контрольными самками не приводило к беременности. Морфофункциональная оценка сперматозоидов эпидидимисов в эти сроки выявила 100% количество неподвижных сперматозоидов. На 142 сутки число подвижных сперматозоидов составило 11% (в контроле 63%).

Культивирование *in vitro* сперматогенных клеток мыши. В результате двухстадийной ферментативной обработки получали гетерогенную популяцию клеток семенника, с преимущественным содержанием соматических клеток и сперматогоний. Иммунофлуоресцентный анализ свежевыведенной суспензии сперматогенных клеток выявил наличие недифференцированных сперматогоний, экспрессирующих маркеры PLZF, NANOG (рисунок 8).

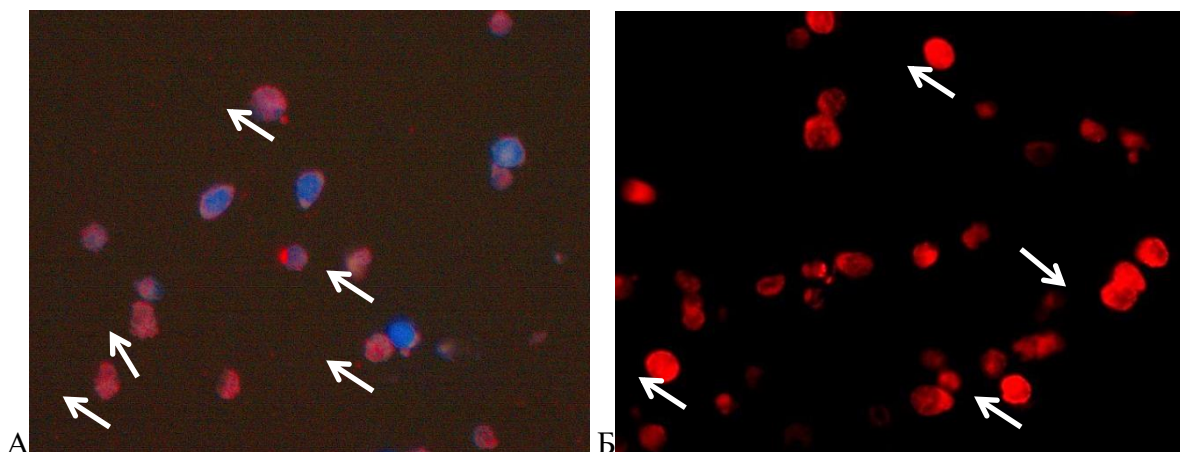


Рисунок 8 – Иммунофлуоресцентный анализ свежеизолированных клеток семенника. А – окрашивание сперматогоний на маркер PLZF (красный сигнал), ядра докрашены DAPI (синий). Б – окрашивание на маркер NANOG (стрелки), ув. x400

Маркер PLZF экспрессируется в недифференцированных сперматогониях (типа As, ССК), его экспрессия также выявляется в предшественниках ССК – гоноцитах. Этот транскрипционный фактор играет важную роль в самообновлении и поддержании пула ССК [16, 17, 29]. Экспрессия транскрипционного фактора NANOG характерна для плюрипотентных стволовых клеток [18], что является подтверждением присутствия ССК.

Через 24 часа культивирования соматические клетки, обладающие высокой адгезивной способностью, прикреплялись ко дну культуральной чашки. Основная часть круглых клеток находилась во взвешенном состоянии и прикреплялась к осевшим соматическим клеткам на 1-2 сутки.

Морфологический анализ фиксированных препаратов выявил наличие в полученной клеточной популяции нескольких типов клеток. Многочисленную группу представляли сперматогонии и клетки Сертоли, наряду с которыми встречались фибробластоподобные клетки и клетки Лейдига. Клетки Сертоли имели крупное ядро и нечеткую прозрачную цитоплазму. Позитивное окрашивание препаратов на виментин и гистохимическое окрашивание на жировой красный О подтвердило наличие клеток Сертоли в полученной клеточной популяции (рисунок 9А).

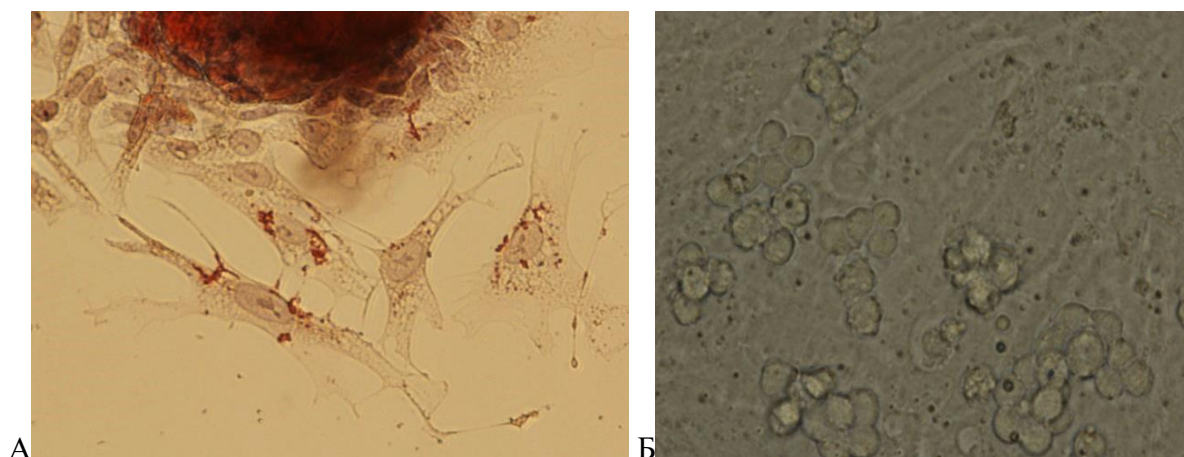


Рисунок 9 – Культура клеток семенника, 48 ч. А - Клетки Сертоли окрашенные на жировой красный О, ув. x400. Б – 72 ч., группа сперматогоний и клеток Сертоли, фазовый контраст, ув. x400

В другой группе клеток через 72 часа культивирования наблюдали начальные этапы дифференцировки сперматогоний: формирование клеточных кластеров, объединенных в группы клеток, формирование цепочек (рисунок 9Б). Дальнейшее культивирование (14 сутки) приводило к образованию дифференцированных сперматогоний типов А1-А4, сперматогоний типа В. Так как клеточная суспензия изначально содержала некоторое количество сперматогоний начальных этапов дифференцировки, то в последующие сроки культивирования (16-42 сутки) мы наблюдали две популяции развивающихся сперматогенных клеток: 60 % сперматоцитов находилось на разных стадий мейоза (прелептотены, пахитены) (рисунок 10А), другая часть характеризовалась появлением сперматид начальных стадий (рисунок 10Б). При иммунофлуоресцентном окрашивании клеточной культуры на маркер Acrosin было подтверждено наличие стадий круглых сперматид, что свидетельствовало об успешном прохождении клетками мейотической фазы (рисунок 11).

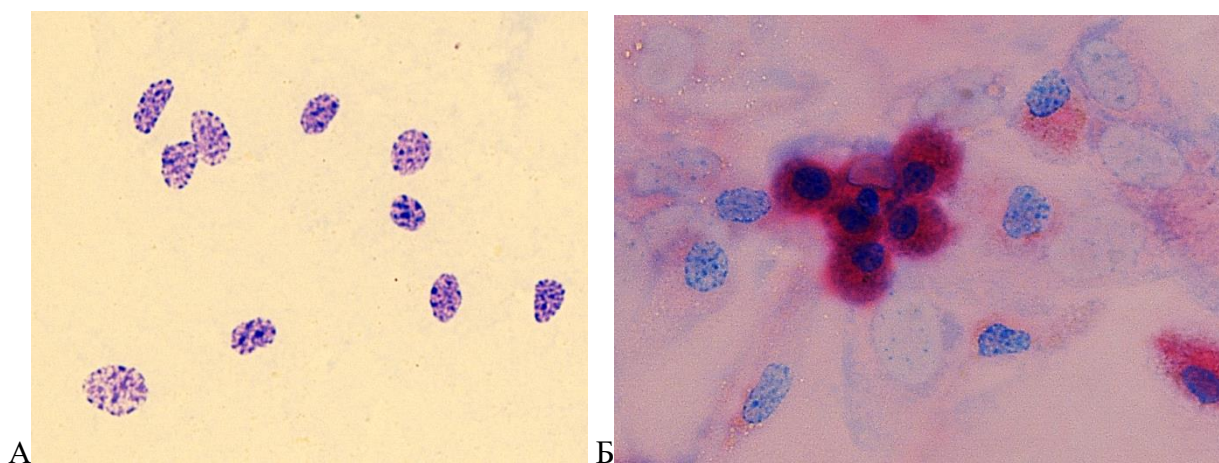


Рисунок 10 – Культура клеток семенника, окрашивание по Романовскому-Гимза, ув. x400. А — 32 сутки, мейотические сперматоциты. Б – 42 сутки, клетки Сертоли - крупные, слабоокрашенные голубые ядра, сперматоцит I мейотического деления, круглые сперматиды

В эти и последующие сутки культивирования сперматиды преобразуются, у них увеличиваются размеры цитоплазмы (появляется как бы «парус») и нередко заметен жгутик – будущий «хвост» сперматозоида (рисунок 11Б). В культуре происходит формирование сперматозоидов (рисунок 12А).

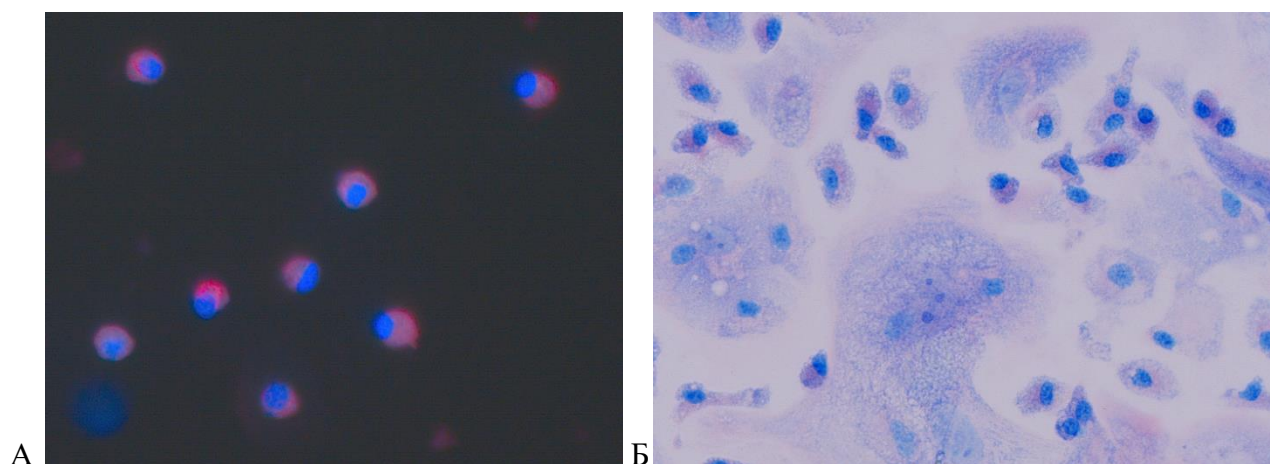


Рисунок 11 – Сперматиды в культуре. А. Иммунофлуоресцентное окрашивание, 16 сутки, сперматиды, формирование акросомальной шапочки (красный цвет), ядра окрашены DAPI (синий). Окрашивание на маркер Acrosin, ув. x400. Б. Преобразование сперматид: увеличение цитоплазмы, появление жгутика. Окраска по Романовскому-Гимза, ув. x400

При дальнейшем культивировании наблюдали преобразование сперматид в сперматозоиды (рисунок 12А, Б).

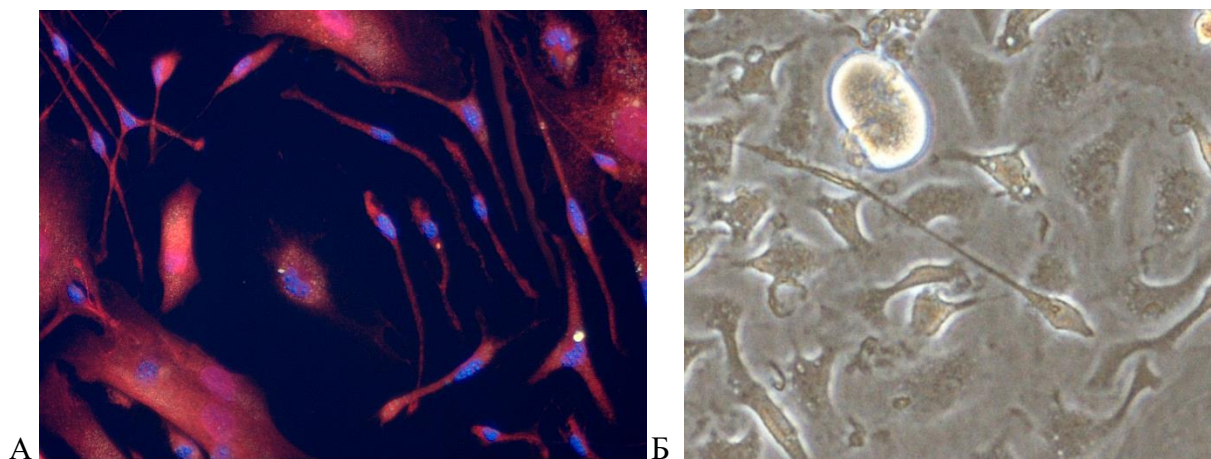


Рисунок 12 – Культура клеток семенника, 30 - 55 сутки. Сперматозоиды, сформировавшиеся в культуре клеток, ув x400. А – иммунофлуоресцентное окрашивание на лектин РНА (ядра окрашены DAPI (синий)). Б - фазовый контраст

Таким образом, создана принципиальная основа развития *in vitro* сперматогенных клеток от стадии сперматогоний (ССК) до стадии сперматозоидов.

Обсуждение. Проведенные эксперименты *in vivo* после воздействия ДОКС, с использованием патоморфологических, иммуногистохимических и цитогенетических методов исследования, позволили создать экспериментальную модель мужской

индуцированной инфертильности. Другие токсиканты, апробированные нами в предварительных исследованиях (3,4-бензо(а)пирен, 3-метилхолантрен, циклофосфамид, этанол и др.), хотя и проявляли себя как выраженные репротоксиканты, не оказывали столь убедительный, стойкий эффект на мужскую репродуктивность. В научной литературе имеются данные об индукции инфертильности другими токсикантами [12, 13], но наш опыт работы с ДОКС позволяет именно его рекомендовать как надежную экспериментальную модель индукции инфертильности. ДОКС, в отличие от многих препаратов, уже при однократном воздействии в дозах 6-10 мг/кг у половозрелых мышей линии C57BL/6 или гибридов F1(C57BL/6 x CBA) приводил к нарушению созревания мужских половых клеток, вплоть до полного опустошения семенных канальцев. Репродуктивная функция отсутствовала. Гистологический анализ показывает, что ведущим в развитии бесплодия является блокировка пула митотически активных сперматогоний, вследствие чего, к 27 суткам в канальцах оставались только те удлинённые сперматиды, которые в момент воздействия были в мейотической стадии развития. После их трансформации в сперматозоиды, последующего притока зрелых сперматогенных клеток не происходило, о чем и свидетельствует полное опустошение канальцев к 36 дню после воздействия. Уменьшение численности сперматозоидов в эпидидимисе подопытных животных обусловлено как нехваткой, поступающих из семенников клеток (гибель клеток в семенниках к 36 дню составила 57,8%, $P < 0,001$, таблица 1) так, возможно, повреждением ДНК действием ДОКС на сперматогенные клетки (около 30% поврежденных клеток к 27 дню, таблица 2), индукцией пикнозов и микроядер (рисунок 2). Двунитевые разрывы ДНК одно из наиболее тяжелых повреждений клетки [41]. Воздействие ДОКС, приводящее к повреждению клеток и ДНК обусловили повышенную продукцию некоторых патологических форм сперматозоидов (типы С, D, Е, таблица 4, рисунок 7 А, Б) и появление новой, правда, в единичных случаях формы как тип К (двойная головка сперматозоида, рисунок 7В, Г).

Снижение в период 18-36 сутки после воздействия численности сперматозоидов (в 2,3 раза по сравнению с контролем), их подвижности (до 23% против 77% в контроле), наряду с ростом генотоксических эффектов (до 29%), безусловно, повлияло на качественную сторону сперматогенеза – оплодотворяющую способность сперматозоидов.

Ни в одном случае, в отличие от контроля, процесс оплодотворения *in vitro* не дал результатов (таблица 3). Спаривание самцов на 36-е сутки после воздействия с контрольными самками также не приводило к беременности. Это говорит об индукции

препаратом стерильности самцов через 4 цикла спермато- и спермиогенеза мыши после введения.

Как долго может длиться, индуцированная ДОКС, инфертильность самцов? Если к 36 суткам наблюдалось полное опустошение семенных канальцев и выявлялись только клетки Сертоли и единичные клетки, напоминающие по морфологии ССК (рисунок 3Б), то на 73 сутки, после воздействия доксорубина в дозе 6 мг/кг, отмечена гиперплазия клеток Лейдига, появление сперматогоний и сперматоцитов (рисунок 4Б), что свидетельствует о начале восстановительных процессов сперматогенного эпителия, скорее всего, обусловленных пролиферативной активностью сохранившихся сперматогоний (ССК). Насколько полным может, быть это восстановление покажут дальнейшие исследования.

По результатам экспериментов на самцах мыши, нам представляется, что воздействие доксорубина может рассматриваться как надежная экспериментальная модель индукции инфертильности.

Вторая предлагаемая нами модель - развитие и созревание *in vitro* сперматогенных клеток мыши, не является собственно моделью инфертильности, но необходима для функциональной кооперации с первой моделью. Изучение на ее основе чувствительности тех или иных этапов сперматогенеза после воздействий токсикантами, оценка тяжести поражений отдельных клеточных компонентов сперматогенного эпителия, изучение донорских качеств развивающихся клеток с целью коррекции индуцированных нарушений репродуктивной функции, позволяет рассматривать эту модель как пул донорских клеток к поиску экспериментального пути терапии индуцированного мужского бесплодия.

Результаты экспериментов *in vitro* показали, что длительное культивирование недифференцированных сперматогоний (ССК) и сперматогоний типа A1-A4 совместно с соматическими клетками семенника, взятыми на 7-8 день постнатального периода, способствует пролиферации и последовательной дифференциации сперматогоний. Показано, что оптимальным фидерным слоем для культивирования сперматогоний мыши в экспериментах являлись собственные соматические клетки семенника, которые большей частью формировались из клеток Сертоли. В итоге, при данных условиях культивирования сперматогонии прошли узловые этапы развития (митотическая активность, мейотические преобразования, гаплоидность, акросомальная реакция) и созревания с образованием сперматозоидов. Все этапы созревания сперматогенных клеток документированы иммуногистохимическими маркерами и расчетами.

Безусловно, данную модель нельзя рассматривать как окончательную форму. Сейчас появляются все новые и новые совершенствования техники культивирования

сперматогенных клеток особенно в формате 3D [17, 34, 35 и др.] и наиболее прогрессивные подходы должны быть использованы в этой модели изучения сперматогенеза и индуцированной инфертильности. В частности, предлагается модель органоидной системы культивирования семенников человека в формате 3D, которую авторы рассматривают как инструмент для скрининга *in vitro* токсикантов, опасных для сперматогенеза человека [20]. К настоящему времени разрабатываются три типа 3D культуральных систем сперматогенеза: суспензионная культура [18, 36], органотипическая культура маленьких фрагментов семенной ткани [37], 3D биопринтирование суспензии клеток [38]. Одним из существенных моментов заключительной фазы культивирования является получение жизнеспособных сперматозоидов, способных к оплодотворению яйцеклеток. В культурах это достигается с помощью ROSI (round spermatid injection) или ICSI (intracytoplasmic sperm injection), что позволяет получить жизнеспособное потомство [14, 39].

Для решения проблем репродукции и, в частности, мужского бесплодия, за последние десятилетия проведена масса клинических и экспериментальных исследований, направленных на заместительную терапию, коррекцию отмечаемых патологических процессов, восстановления функции сперматогенного эпителия и качества сперматозоидов.

Идеальной моделью коррекции (терапии) мужского бесплодия была бы экспериментальная аналогия с ЭКО, при которой донорский материал хранился бы или воссоздавался для конкретного пациента, т.е. был бы использован аутологический материал. Так, в радиационной и химиотерапии онкологических заболеваний у мужчин осложнение фертильной функции является как прямым эффектом репротоксикантов, так и проявлением последствий у потомства, получавших подобную терапию внутриутробно при лечении онкобольных беременных женщин [10]. Криоконсервация семени взятого у мужчин до терапии и использование его после размораживания для оплодотворения, не всегда бывает успешным и для повышения оплодотворяющей способности чаще используют ICSI (intracytoplasmic sperm injection). Однако и этот подход имеет недостаток, так как позволяет обходить естественные селекционные барьеры для генетически поврежденных клеток, что требует тщательного предварительного генетического анализа сперматозоидов [40].

Часть исследований предполагает восстановление собственного генетического материала за счет взятого из замороженного у новорожденных мальчиков биопсийного материала яичек с последующей трансплантацией уже половозрелым мужчинам с возникшей по той или иной причине инфертильностью [41].

Наиболее необычным способом в этом направлении является стремление к перепрограммированию соматических клеток пациента в статус половых и последующей

трансплантацией пациентам созданных de novo сперматозоидов. Если не придерживаться совпадения генетического статуса пациента и сперматогенного материала, то реальными выглядят эксперименты с ЭСК (эмбриональные стволовые клетки), от которых отделяют сформировавшиеся в эпибласте развивающейся in vitro яйцеклетки ППК (первичные половые клетки), дальнейшее развитие которых может привести к созреванию in vitro сперматогенных клеток. Другой экспериментальный путь, выбранный нами, предусматривает культивирование in vitro ССК (сперматогенные стволовые клетки) мыши от формирующихся сперматогоний до полного созревания сперматозоидов в их естественном окружении. Одновременное создание экспериментальной модели infertility у самцов мыши будет объектом аллогенных трансплантаций. Наши исследования и создание описанных выше моделей направлены на развитие способов экспериментальной коррекции (восстановления) семенников с нарушенным воспроизводством сперматогенных клеток за счет донорских (аутологичных, аллогенных) трансплантаций материалов, полученных в экспериментах in vivo и in vitro.

Выводы. 1. В экспериментах на мышах с однократным воздействием антрациклинового антибиотика и цитотоксического препарата доксорубицина создана модель индуцированной мужской infertility.

2. В экспериментах in vitro создана модель развития и созревания сперматогенных клеток от сперматогоний до зрелых сперматозоидов.

3. Созданные модели направлены на развитие способов экспериментальной коррекции (восстановления) семенников с нарушенным репротоксикантами воспроизводством сперматогенных клеток за счет донорских (аутологичных, аллогенных) трансплантаций материалов, полученных в экспериментах in vivo и in vitro.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barratt C.L.R., Björndahl L., De Jonge C.J., et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance—challenges and future research opportunities. *Hum Reprod Update*. 2017; 23:660-680.
2. Гамидов С., Авакян А., Идиопатическое бесплодие у мужчин: эпидемиология, этиология, патогенез, лечение. *Врач*. 2013; 7:2-4.
3. Kumar N., Singh A.K. Trends of Male Factor Infertility, an Important Cause of Infertility: A Review of Literature. *J Hum Reprod Sci*. 2015; 8:191–196. doi:10.4103/0974-1208.170370

4. Levine H., Jørgensen N., Martino-Andrade A., et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update*. 2017; 23:646-659.
5. World Health Organization, WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. 2010, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 5th edition
6. Кириленко Е.А. Эмпирическая терапия идиопатического бесплодия у мужчин. 2016: <https://мцрз.рф/files/imb.pdf>
7. Miyamoto T., Tsujimura A., Miyagawa Y., Koh E., et al. Male infertility and its causes in human. *Advances in Urology, Male Infertility*. Hindawi Publishing Corporation. 2011, 2012. doi: 10.1155/2012/384520.
8. Азизов А.П., Саидов М.С. *Мужское бесплодие*. 2010; 51.
9. Triarico S., Rivetti S., Capozza M.A., et al. Transplacental Passage and Fetal Effects of Antineoplastic Treatment during Pregnancy. *Cancers*. 2022; 14(13): 3103.
10. Arnon J., Meirow D., Lewis-Roness H., Ornoy A. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Human Reproduction Update*. 2001; 7(4): 394-403.
11. Sharpe R.M. Environmental/lifestyle Effects on Spermatogenesis. *Philos Trans R Soc London Ser B Biol Sci*. 2010; 365(1546):1697–712.
12. Siu E.R, Mruk D.D, Porto C.S, Cheng C.Y. Cadmium-Induced Testicular Injury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 238:240–249.
13. Baillie H.S., Pacey A.A., Moore H.D.M. Environmental chemicals and the threat to male fertility in mammals: evidence and perspective In *Conservation Biology 8. Reproductive Science and Integrated Conservation*. Eds W.V Holt, A.R Pickard, JC Rodgers & DE Wilat. Cambridge, UK: Cambridge University Press ; 2003.
14. Komeya M., Kimura H., Nakamura H., et al. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Sci Rep*. 2016; 6: 21472.
15. McLean D.J. Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. *Cell Tissue Res*. 2005; 322: 21–31.
16. Wang X, Rivière I. genetic engineering and manufacturing of hematopoietic stem cells. *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development*. 2017; 5: 94-105.
17. Richer G., Baert Y., Goossens E. In-vitro spermatogenesis through testis modelling: Toward the generation of testicular organoids *Andrology*. 2020; 8 (4): 879–891.
18. Stukenborg J.B., Schlatt S., Simoni M., et al. New horizons for in vitro spermatogenesis? An update on novel three-dimensional culturesystems as tools for meiotic and post-meiotic differentiation of testicular germ cells. *Mol Hum Reprod*. 2009; 15:521-529.

19. Choi N.Y., Park Y.S., Ryu J.S., Lee H.J. A novel feeder-free culture system for expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Mol. Cells* 2014; 37(6): 473-479.
20. Pendergraft S.S., Sadri-Ardekani H., Atala A., Bishop C.E. Three-dimensional testicular organoid: a novel tool for the study of human spermatogenesis and gonadotoxicity in vitro. *Biol Reprod.* 2017; 96(3):720-732
21. Chapin R.E., Winton T., Nowland W. et al. Lost in translation: The search for an in vitro screen for spermatogenic toxicity. *Birth Defects Res B.* 2016; 107: 225–242.
22. Morgan S., Lopes F., Gourley C. et al. Cisplatin and doxorubicin induce distinct mechanisms of ovarian follicle loss; imatinib provides selective protection only against cisplatin. *PLoS One.* 2013; 8(7): 20117
23. Ben-Aharon I., Bar-Joseph H., Tzarfaty G. Doxorubicin-induced ovarian toxicity. *Reproductive biology and endocrinology.* 2010; 8:20.
24. Wang Q.L, Sun S.C, Han J. et al. Doxorubicin induces early embryo apoptosis by inhibiting poly(ADP ribose) polymerase. *In Vivo.* 2012; 26(5):827-34.
25. Akinjo O.O, Gant T.W, Marczylo E.L. Marczylo Perturbation of epigenetic processes by doxorubicin in the mouse testis. *Toxicol. Res.* 2016; 5: 1229–1243.
26. Wyrobek A.J., Bruce W.R. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1975; 72(11): 4425-4429.
27. Watanabe T., Endo A. Effects of selenium deficiency on sperm morphology and spermatocyte chromosomes in mice. *Mutation Research.* 1991; 262: 93-99.
28. Савченкова И.П., Васильева С.А. Культивирование сперматогоний хряка на клетках Сертоли. *Цитология.* 2016; 58 (2): 135-142.
29. Волкова Н.А., Коржикова С.В., Котова Т.О. и др. Выделение, культивирование и характеристика сперматогониев петуха. *Сельскохозяйственная биология.* 2013; 51 (4): 450-458.
30. Kaavya R., Kannan T.A., Basha S. H. Vairamuthu S., et al. Isolation of spermatogonial stem cell and its viability in mice by different enzymatic digestion methods. *International J. of livestock research.* 2016; 6(11): 54-60.
31. Oakberg E.F. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat.* 1956; 99(3): 507-516.
32. Costoya J.A., Hobbs R.M., Barna M. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat. Genet.* 2004; 36: 653-662.
33. Morrison AJ, Shen X. Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10(6): 373-84. doi: 10.1038/nrm2693.

34. Sakib S., Uchida A., Valenzuela-Leon P., Yu Y., et al. Formation of organotypic testicular organoids in microwell culture. *Biology of Reproduction*. 2019; 100(6): 1648–1660.
35. Nengzhuang W., Jiaming S., Minghua LIU, Long M.A, et al. A brief history of testicular organoids: from theory to the wards. 2022; 39(7):1423-1431.
36. Stukenborg J.-B., Jahnukainen K. In vitro spermatogenesis and its potential clinical implication for patients. in genetics of human infertility. *Monogr Hum Genet., Vogt PH (ed), Basel, Karger*. 2017; 21: 162–172.
37. Sato T., Katagiri K., Gohbara A., et al. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*. 2011; 471: 501-507.
38. Baert Y., Dvorakova-Hortova K., Margaryan H., Goossens E. Mouse in vitro spermatogenesis on alginate-based 3D bioprinted scaffolds. *Biofabrication*. 2019; 11: 03501. doi: 10.1088/1758-5090/ab1452.
39. Tetsuhiro Y., Sato T., Katagiri K. In vitro spermatogenesis using an organ culture technique. In: *Spermatogenesis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 2013; 927: 479–88.
40. Baschat A.A., Schwinger E., Diedrich K. Debate. Assisted reproductive techniques. Are we avoiding the genetic issue? *Hum. Reprod*. 1996; 11:926-928.
41. Picton H.M., Wyns C., Anderson R.A., et al. A European perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys. *Hum Reprod*. 2015; 30:2463-2475.

References

1. Barratt CLR, Björndahl L, De Jonge CJ, Lamb DJ, Osorio Martini F, McLachlan R, Oates RD, van der Poel S, St John B, Sigman M, Sokol R, Tournaye H. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Hum Reprod Update*. 2017 Nov 1; 23(6):660-680. doi: 10.1093/humupd/dmx021. PMID: 28981651; PMCID: PMC5850791.
2. Gamidov C., Avakjan A., Idiopathic infertility in men: epidemiology, etiology, pathogenesis, treatment. *Vrach*. 2013; 7:2-4. (in Russian)
3. Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci*. 2015 Oct-Dec;8(4):191-6. doi: 10.4103/0974-1208.170370. PMID: 26752853; PMCID: PMC4691969
4. Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I, Pinotti R, Swan SH. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression

analysis. *Hum Reprod Update*. 2017 Nov 1;23(6):646-659. doi: 10.1093/humupd/dmx022. PMID: 28981654; PMCID: PMC6455044.

5. World Health Organization, WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. 2010, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 5th edition
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44261/9789241547789_eng.pdf?sequence=1

6. Kirilenko E. A. Empiric treatment of idiopathic infertility in men. 2016: <https://mup3.pф/files/imb.pdf> (in Russian)

7. Miyamoto T., Tsujimura A., Miyagawa Y., Koh E., et al. Male infertility and its causes in human. *Advances in Urology, Male Infertility*. Hindawi Publishing Corporation. 2011, 2012

8. Azizov A.P., Saidov M.S. Male infertility 2010; Makhachkala, s. 51. (in Russian)

9. Triarico S, Rivetti S, Capozza MA, Romano A, Maurizi P, Mastrangelo S, Attinà G, Ruggiero A. Transplacental Passage and Fetal Effects of Antineoplastic Treatment during Pregnancy. *Cancers (Basel)*. 2022 Jun 24;14(13):3103. doi: 10.3390/cancers14133103. PMID: 35804875; PMCID: PMC9264939.

10. Arnon J, Meirow D, Lewis-Roness H, Ornoy A. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Hum Reprod Update*. 2001 Jul-Aug;7(4):394-403. doi: 10.1093/humupd/7.4.394. PMID: 11476352.

11. Sharpe RM. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010 May 27;365(1546):1697-712. doi: 10.1098/rstb.2009.0206. PMID: 20403879; PMCID: PMC2871918.

12. Siu ER, Mruk DD, Porto CS, Cheng CY. Cadmium-induced testicular injury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Aug 1;238(3):240-9. doi: 10.1016/j.taap.2009.01.028. Epub 2009 Feb 21. PMID: 19236889; PMCID: PMC2804910.

13. Baillie H. S., Pacey A. A., Moore H.D.M. Environmental chemicals and the threat to male fertility in mammals: evidence and perspective In *Conservation Biology 8. Reproductive Science and Integrated Conservation*. Eds W.V Holt, A.R Pickard, JC Rodgers & DE Wilat. Cambridge, UK: Cambridge University Press ; 2003, pp57–66.

14. Komeya M, Kimura H, Nakamura H, Yokonishi T, Sato T, Kojima K, Hayashi K, Katagiri K, Yamanaka H, Sanjo H, Yao M, Kamimura S, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Fujii T, Ogawa T. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Sci Rep*. 2016 Feb 19;6: 21472. doi: 10.1038/srep21472. PMID: 26892171; PMCID: PMC4759809.

15. McLean DJ. Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. *Cell Tissue Res.* 2005 Oct;322(1): 21-31. doi: 10.1007/s00441-005-0009-z. Epub 2005 Nov 3. PMID: 16047158.
16. Wang X, Rivière I. Genetic Engineering and Manufacturing of Hematopoietic Stem Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017 Mar 18;5:96-105. doi: 10.1016/j.omtm.2017.03.003. PMID: 28480310; PMCID: PMC5415326.
17. Richer G, Baert Y, Goossens E. In-vitro spermatogenesis through testis modelling: Toward the generation of testicular organoids. *Andrology.* 2020 Jul;8(4):879-891. doi: 10.1111/andr.12741. Epub 2020 Jan 9. PMID: 31823507; PMCID: PMC7496450.
18. Stukenborg JB, Schlatt S, Simoni M, Yeung CH, Elhija MA, Luetjens CM, Huleihel M, Wistuba J. New horizons for in vitro spermatogenesis? An update on novel three-dimensional culture systems as tools for meiotic and post-meiotic differentiation of testicular germ cells. *Mol Hum Reprod.* 2009 Sep;15(9):521-9. doi: 10.1093/molehr/gap052. Epub 2009 Jun 27. PMID: 19561342.
19. Choi NY, Park YS, Ryu JS, Lee HJ, Araúzo-Bravo MJ, Ko K, Han DW, Schöler HR, Ko K. A novel feeder-free culture system for expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Mol Cells.* 2014 Jun;37(6):473-9. doi: 10.14348/molcells.2014.0080. Epub 2014 May 23. PMID: 24854861; PMCID: PMC4086341.
20. Pendergraft SS, Sadri-Ardekani H, Atala A, Bishop CE. Three-dimensional testicular organoid: a novel tool for the study of human spermatogenesis and gonadotoxicity in vitro. *Biol Reprod.* 2017 Mar 1;96(3):720-732. doi: 10.1095/biolreprod.116.143446. PMID: 28339648.
21. Chapin RE, Winton T, Nowland W, Danis N, Kumpf S, Johnson K, Coburn A, Stukenborg JB. Lost in translation: The search for an in vitro screen for spermatogenic toxicity. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2016 Dec;107(6):225-242. doi: 10.1002/bdrb.21188. Epub 2016 Dec 26. PMID: 28024311.
22. Morgan S., Lopes F., Gourley C. et al. Cisplatin and doxorubicin induce distinct mechanisms of ovarian follicle loss; imatinib provides selective protection only against cisplatin. *PLoS One.* 2013; 8(7):e70117
23. Ben-Aharon I, Bar-Joseph H, Tzarfaty G, Kuchinsky L, Rizel S, Stemmer SM, Shalgi R. Doxorubicin-induced ovarian toxicity. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010 Mar 4;8:20. doi: 10.1186/1477-7827-8-20. PMID: 20202194; PMCID: PMC2838903.
24. Wang QL, Sun SC, Han J, Kwak YC, Kim NH, Cui XS. Doxorubicin induces early embryo apoptosis by inhibiting poly(ADP ribose) polymerase. *In Vivo.* 2012 Sep-Oct;26(5):827-34. PMID: 22949597.

25. Akinjo OO, Gant TW, Marczylo EL. Perturbation of epigenetic processes by doxorubicin in the mouse testis. *Toxicol Res (Camb)*. 2016 Jun 1;5(4):1229-1243. doi: 10.1039/c6tx00078a. PMID: 30090428; PMCID: PMC6062377.
26. Wyrobek AJ, Bruce WR. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Nov;72(11):4425-9. doi: 10.1073/pnas.72.11.4425. PMID: 1060122; PMCID: PMC388734.
27. Watanabe T, Endo A. Effects of selenium deficiency on sperm morphology and spermatocyte chromosomes in mice. *Mutat Res*. 1991 Feb;262(2):93-9. doi: 10.1016/0165-7992(91)90113-i. PMID: 2000100.
28. Savchenkova I.P., Vasil'eva S.A. Cultivation of boar spermatogonia on Sertoli cells. *Tsitologiya*. 2016; 58 (2): 135-142. (in Russian)
29. Volkova N.A., Korzhikova S.V., Kotova T.O., A.N. Vetokh, L.A. Volkova, N.A. Zinov'eva. Isolation, cultivation and characterization of rooster spermatogonia. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2013; 51 (4): 450-458. (in Russian)
30. Kaavya R., T.A.Kannan, Sabiha Hayath Basha, S.Vairamuthu, Geetha Ramesh and B. Justin William. Isolation of spermatogonial stem cell and its viability in mice by different enzymatic digestion methods. *International J. of livestock research*. 2016; 6(11): 54-60.
31. Oakberg E.F. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat*. 1956; 99(3):507-16. doi: 10.1002/aja.1000990307. PMID: 13402729.
32. Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, Orwig KE, Wolgemuth DJ, Pandolfi PP. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet*. 2004 Jun;36(6):653-9. doi: 10.1038/ng1367. Epub 2004 May 23. PMID: 15156143.
33. Morrison AJ, Shen X. Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Jun;10(6):373-84. doi: 10.1038/nrm2693. Epub 2009 May 8. PMID: 19424290; PMCID: PMC6103619.
34. Sakib S, Uchida A, Valenzuela-Leon P, Yu Y, Valli-Pulaski H, Orwig K, Ungrin M, Dobrinski I. Formation of organotypic testicular organoids in microwell culture. *Biol Reprod*. 2019 Jun 1;100(6):1648-1660. doi: 10.1093/biolre/ioz053. PMID: 30927418; PMCID: PMC7302515.
35. Nengzhuang W, Jiaming S, Minghua LIU, Long MA, Lina QIN, Xuemei GE, Hongli YAN. A brief history of testicular organoids: from theory to the wards. *J Assist Reprod Genet*. 2022 Jul;39(7):1423-1431. doi: 10.1007/s10815-022-02529-6. Epub 2022 Jun 2. PMID: 35653042; PMCID: PMC9365919.

36. Stukenborg J.-B., Jahnukainen K. In vitro Spermatogenesis and Its Potential Clinical Implication for Patients. In Genetics of Human Infertility. Monogr Hum Genet., Vogt PH (ed), Basel, Karger. 2017; 21, pp 162–172.
37. 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; 471: 501-507
38. Baert Y, Dvorakova-Hortova K, Margaryan H, Goossens E. Mouse in vitro spermatogenesis on alginate-based 3D bioprinted scaffolds. *Biofabrication*. 2019 Apr 26;11(3):035011. doi: 10.1088/1758-5090/ab1452. PMID: 30921781.
39. Yokonishi T, Sato T, Katagiri K, Ogawa T. In vitro spermatogenesis using an organ culture technique. *Methods Mol Biol*. 2013;927:479-88. doi: 10.1007/978-1-62703-038-0_41. PMID: 22992938.
40. Baschat A.A., Schwinger E., Diedrich K. Debate. Assisted reproductive techniques - are we avoiding the genetic issues? *Hum Reprod*. 1996 May;11(5):926-8. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019321. PMID: 8671362.
41. Picton H.M., Wyns C., Anderson R.A, Goossens E., Jahnukainen K., Kliesch S., Mitchell R.T., Pennings G., Rives N., Tournaye H., van Pelt A.M., Eichenlaub-Ritter U., Schlatt S.; ESHRE Task Force On Fertility Preservation In Severe Diseases. A European perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys. *Hum Reprod*. 2015 Nov;30(11):2463-75. doi: 10.1093/humrep/dev190. Epub 2015 Sep 10. PMID: 26358785.