

УДК 576.08

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ ПРИМЕНЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ ЖИВОТНЫХ

© 2023 г. М. А. Тамбовский^а, *, А. М. Аймалетдинов^а, Е. Ю. Закирова^а

^аКазанский (Приволжский) федеральный университет,
Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, 420008 Россия

*e-mail: taxim.tambovsky.kfu@gmail.com

Поступила в редакцию 14.02.2023 г.

После доработки 04.05.2023 г.

Принята к публикации 26.05.2023 г.

Криоконсервация сперматозоидов является важной частью сохранения половых клеток различных организмов. Однако при заморозке гамет часто возникают различного рода повреждения, которые оказывают значительное влияние при искусственном оплодотворении. После размораживания, как правило, сперматозоиды имеют ультраструктурные, биохимические и функциональные изменения, такие как повреждение клеточной мембраны и хроматина, окислительный стресс. Так как сперматозоиды обладают ограниченной способностью к биосинтетической деятельности, они имеют низкую способность к регенерации. Современные тенденции заключаются в совершенствовании режима криоконсервации спермы с использованием естественных внеклеточных везикул и стволовых клеток. Внеклеточные везикулы и стволовые клетки обладают потенциальным регенеративным эффектом, поскольку содержат различные биологически активные молекулы, влияющие на репарацию сперматозоидов. Настоящий обзор посвящен современным стратегиям улучшения состояния сперматозоидов после криоконсервации. В частности, в этом обзоре описаны результаты исследований использования внеклеточных везикул и стволовых клеток в качестве криопротекторов при заморозке и оттаивании сперматозоидов.

Ключевые слова: криоконсервация, криоповреждение, сперматозоиды, внеклеточные везикулы, стволовые клетки

DOI: 10.31857/S0233475523050110, EDN: FDMSUL

ВВЕДЕНИЕ

Искусственное оплодотворение и криоконсервирование сперматозоидов являются одним из величайших достижений, которые произвели революцию не только в селекционной промышленности, но и в репродуктивной медицине [1]. Благодаря использованию замороженной спермы и искусственного осеменения, семенной материал от лучших племенных быков может быть использован для осеменения коров по всему миру [2]. Замораживание спермы животных считается обязательным условием сохранения генетического материала от особей с высокой племенной ценностью, а также для животных, находящихся под угрозой исчезновения.

При этом качественная криоконсервация спермы повышает эффективность и успешность искусственного осеменения. Несмотря на достаточно длительный период использования криоконсервации в качестве сохранения спермы, процедуры замораживания не всегда эффективны [3]. Извест-

но, что криоконсервация негативно влияет на качественные характеристики спермы, вызывая изменения на структурном и молекулярном уровнях вследствие термических, механических, осмотических и окислительных повреждений (рис. 1), что, в свою очередь, влияет на способность к оплодотворению и последующее раннее эмбриональное развитие [4].

Также остро стоит вопрос о сохранении половых клеток у редких особей/видов животных, которые плохо переносят криоконсервацию. Реабилитация поврежденных сперматозоидов была бы решающим шагом для увеличения количества фертильных сперматозоидов. Методы улучшения результатов искусственного оплодотворения необходимы для воспроизводства диких кошачьих, особенно снежных барсов, которые плохо размножаются даже в своей естественной среде обитания и практически не размножаются в неволе [5].

Одним из определяющих факторов результативности искусственного осеменения является



Рис. 1. Возможные повреждения сперматозоидов, возникающие после криоконсервации.

совершенствование методов хранения спермы животных в охлажденном или глубоком заморозенном состоянии. Значительная часть исследовательских работ по криоконсервации спермы сосредоточена на методах/подходах к повышению эффективности замораживания, которые основываются на защите сперматозоидов от повреждающего действия процедуры замораживания, посредством применения различных разбавителей, криопротекторов, антиоксидантов и питательных компонентов [6].

На современном этапе развития криобиологии отдельное внимание уделяется восстановлению поврежденных сперматозоидов во время замораживания и оттаивания. В данном обзоре освещаются стратегии защиты и/или восстановления повреждений сперматозоидов, возникающих во время криоконсервации при использовании клеток животных или их производных совместно с традиционными криопротекторами.

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕРМЫ ЖИВОТНЫХ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) являются неотъемлемой частью регенеративной ветеринарии [7, 8] и медицины [9, 10]. Считается, что восстановление поврежденной ткани происходит за счет мультипотентной природы МСК и связанными с ней паракринными механизмами, включающими секрецию различных сигнальных факторов, главным образом белков [11].

Qamar и соавт. показали, что использование МСК при криоконсервации спермы может быть эффективным биологическим подходом к повы-

шению фертильности и жизнеспособности сперматозоидов, а также путем поддержки механизмов восстановления посредством секреции различных белков МСК [12]. В исследовании изучалось влияние МСК собаки, выделенных из жировой ткани (ЖТ; Adipose-Derived Stem Cells, ADSC) на выживаемость сперматозоидов собак. При этом МСК-ЖТ добавляли перед замораживанием спермы, перемешивали и затем смесь подвергали криоконсервации в криосреде. После оттаивания авторы отмечали улучшение качества сперматозоидов в образцах с ADSC. Вероятно, это происходило за счет воздействия стволовых клеток на механизмы восстановления, оказывающих влияние как на клеточном, так и на молекулярном уровнях на сперматозоиды. Возможной причиной улучшения могли быть белки, секретируемые ADSC, такие как аннексин, дисферлин и фибронектин, которые обычно участвуют в репарации на клеточном уровне [12].

Известно, что аннексины играют важную роль в экзоцитозе, эндоцитозе, агрегации, слиянии мембран, а связывание с Ca^{2+} -зависимой мембраной делает их подходящими для восстановления мембран [13]. Кроме того, аннексин 1 и 2 вместе с белком дисферлином участвуют в Ca^{2+} -зависимой репарации сарколеммы скелетных миоцитов [14].

Фибронектин регулирует клеточные процессы, а также поддержание и восстановление поврежденных тканей. Кроме того, этот белок, находящийся в семенной плазме, оказывает влияние на активацию протеасом, акросомную реакцию, конденсацию, взаимодействие гамет и эмбриональное развитие [15].

Предположение авторов исследования о влиянии аннексина, дисферлина и фибронектина на большую сохранность мембран замороженных сперматозоидов было основано на высоких уровнях экспрессии генов этих белков в сперме в опытных образцах по сравнению с контрольными [12].

Следовательно, ADSC поддерживали механизмы восстановления в сперме, взаимодействуя со сперматозоидами посредством выработки различных биологически активных веществ, которые являются неотъемлемой частью механизмов репарации. Дальнейшие исследования в этом направлении необходимы для определения других факторов, секретируемых ADSC, которые могут играть активную роль в сохранении качества спермы после криоконсервации.

Дальнейшие исследования *in vivo* также помогли бы показать эффективность применения ADSC при криоконсервации спермы. Возможно, использование спермы, дополненной ADSC для искусственного оплодотворения, также может быть полезным в решении проблем, связанных с женским репродуктивным трактом, ввиду их регенеративной и мультипотентной природы [12].

ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕРМЫ ЖИВОТНЫХ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Экзосомы, микровезикулы (МВ) – это микроскопические внеклеточные везикулы (ВВ) диаметром в несколько нанометров, выделяемые в межклеточное пространство клетками различных тканей. Существует несколько типов ВВ, различающихся по происхождению, размерам и т.д. (табл. 1). Известно, что ВВ осуществляют связь между клетками, поскольку могут переносить белки, нуклеиновые кислоты и липиды, опосредуя паракринный механизм регуляции жизнедеятельности тканей или клеток реципиента [16]. А также МВ, секретируемые МСК участвуют в регенерации поврежденных эндогенных клеток посредством перемещения трофических и регуляторных молекул [17].

В исследованиях, проведенных Qatag с соавт. показано, что экзосомы, полученные из МСК-ЖТ, улучшают качество спермы собак после оттаивания при совместной криоконсервации [18].

Добавление оптимальной концентрации экзосом (50 мкг/мл) значительно увеличивало подвижность и долю живых сперматозоидов после оттаивания. При этом процент сперматозоидов с неповрежденной плазматической мембраной был статистически выше в образцах с добавлением экзосом, чем в контрольных.

Оценка мРНК после оттаивания показала значительно более высокий уровень экспрессии генов, связанных с восстановлением плазматиче-

ской мембраны (*ANX1, DYSF, FNI*), компонентов хроматина (*H3, HMGB1*), с одновременной более низкой экспрессией гена, связанного с производством активных форм кислорода в опытных образцах, чем в контрольных образцах спермы собак. По результатам теста на проникновение в слизь была показана гиперактивация обработанной экзосомами спермы. При этом значительно большее количество обработанных сперматозоидов проникло на глубину 1 и 3 см, чем в контрольной группе. Тест на проникновение в слизь показывает способность сперматозоидов проникать в суррогатную цервикальную слизь и обычно используется для оценки оплодотворения *in vitro* и *in vivo* и частоты беременности. Авторы считают, что описанные эффекты обусловлены экзосомальными белками, которые защищают сперму от окислительного повреждения, а также индуцируют восстановление мембран и хроматина [18].

Mokarizadeh с соавт. [19] показали, что добавление в образцы спермы естественных МВ, полученных из МСК костного мозга крыс, приводит к повышению качества криоконсервированной спермы крыс. При этом происходит появление и/или увеличение экспрессии молекул поверхностной адгезии CD54, CD106, CD44 и CD29. Эти результирующие изменения экспрессии белков клеточной мембраны сперматозоида, вероятно, являются прямым следствием включения МВ, содержащих молекулы адгезии (как на транслируемом уровне мРНК, так и на уровне белка), в мембрану половых клеток. При этом повышенная экспрессия CD54, CD106, CD29 и CD44 в значительной степени зависит от количества МВ, используемых при криоконсервации. Функциональные последствия таких изменений экспрессии могут влиять на улучшение адгезивных свойств сперматозоидов, а также на повышение чувствительности к паракринной и контактной сигнализации с яйцеклетками [19].

Однако не все экзосомы, полученные из различных типов клеток, обладают одинаковым криозащитным эффектом при замораживании со сперматозоидами. Согласно исследованию Mahiddine и соавт. [20] экзосомы МСК амниотической мембраны собак не обладают криопротекторными свойствами по отношению к сперматозоидам, по крайней мере при использовании их в качестве добавок в концентрации 2 мкг/мл и ниже. Необходимо отметить также отсутствие отрицательного влияния экзосом из МСК амниотической мембраны на сперматозоиды собак при криоконсервации.

Согласно литературным данным, экзосомы могут действовать на одну и ту же ткань по-разному в зависимости от их концентрации и прохождения клеток – доноров экзосом [21]. Вероятнее всего, это зависит от содержания веществ в меж-

Таблица 1. Классификация внеклеточных везикул

Внеклеточные везикулы	Размер, нм	Особенности образования	Внутреннее содержание	Предполагаемые функции
Апоптотические тельца	1000–5000	Формируются на терминальных стадиях клеточной гибели при фрагментации клетки на части, окружены клеточной мембраной. Отличительной чертой апоптотических телец от других типов внеклеточных везикул является проницаемая мембрана	Геномная ДНК, целые органеллы, рРНК. Основной маркер – аннексин 5	Осуществляют межклеточное взаимодействие. Могут опосредовать горизонтальный перенос ДНК, РНК и рассматриваться как переносчики сигналов между клетками
Микровезикулы	100–1000	Образуются путем выпячивания и отпочкования участков плазматической мембраны клетки	В целом близки к экзосомам. Есть данные о содержании в них различных белков клеточной адгезии, компонентов цитоскелета, матричных металлопротеиназ, гликопротеинов, митохондриальных, центросомных и рибосомных белков. Отсутствуют обязательные компоненты экзосом – тетраспанины, флотилины, аннексины и белки ESRT. Основные маркеры – CD40, CD62	Осуществляют межклеточное взаимодействие. Предполагается их роль в качестве биологических маркеров заболеваний
Экзосомы	30–150	Мембранная частица эндоцитозного происхождения, образующаяся внутри мультивезикулярных эндосомальных телец	Содержимое экзосом отражает цитозольный состав клеток-доноров: неспецифические и тканеспецифические белки, различные виды РНК. Характерно присутствие большого количества онкогенных белков и влияние на пролиферацию и миграцию клеток в большей степени, чем для микровезикул. Основные маркеры – CD63, CD9, Alix, TSG101	Осуществляют межклеточное взаимодействие

клеточных везикулах, так как важнейшее их свойство — это регуляция экспрессии генов в клетках-мишенях при слиянии с мембраной и выделении своего содержимого в цитоплазму [22]. В настоящее время доказано, что экзосомы, как и другие ВВ, переносят клеточно-специфические компо-

ненты клетки-источника в клетку-реципиент [23]. Известно, что МСК амниотической мембраны способны к дифференцировке и трансдифференцировке как МСК из других тканей. Но обладают уникальными иммунофенотипическими характеристиками, которые отличают эти клетки от

других МСК. Поскольку амниотическая мембрана имеет эмбриональное происхождение, уровни экспрессии эмбриональных маркеров, включая OCT3/4, SOX2, Klf4, c-Myc, Nanog и Lin28, в МСК амниотической мембраны намного выше, чем у МСК костного мозга. Также эти клетки экспрессируют маркеры плюрипотентности, такие как *L*-щелочная фосфатаза, TRA-2-39, OCT4, Nanog, SOX2 и Rex1, которые специфически экспрессируются в эмбриональных и зародышевых стволовых клетках [24]. Существует мнение, что МСК амниотической мембраны являются более примитивными, чем МСК, обнаруженные в костном мозге [25]. Отсутствие полезных эффектов экзосом из МСК амниотической мембраны может быть объяснено типом клеток и, следовательно, факторами, которые они секретируют [26].

Неоднозначным влиянием на сохранность сперматозоидов после криоконсервации обладают и ВВ семенной плазмы у разных видов животных. ВВ вырабатываются в мужских половых путях, включая придаток яичка и простату. Показано, что ВВ участвуют в регуляции функции сперматозоидов посредством связывания и последующего слияния с их мембраной, осуществляя интеграцию цитозольного и мембранного составляющего в половую клетку. В настоящий момент еще четко не определены все необходимые условия для связывания и слияния этих везикул с клеткой-реципиентом. Кроме того, достоверно установлено, что перенос молекул белка от везикул семенной плазмы к сперматозоидам возможен только при наличии определенного значения pH, температуры и в присутствии цинка [27].

Результаты исследований ряда авторов показали, что экзосомы семенной плазмы (ЭСП) обладают криопротекторным действием по отношению к сперматозоидам [22, 28]. Исследования Du с соавт. продемонстрировали, что ЭСП хряка могут усиливать антиоксидантные свойства сперматозоидов, снижать содержание малонового диальдегида, поддерживая целостность плазматической мембраны сперматозоидов, улучшать подвижность сперматозоидов, а также подавлять преждевременную капацитацию. Флуоресцентная и сканирующая электронная микроскопия продемонстрировали, что экзосомы напрямую связываются с мембраной головки сперматозоида. По мнению исследователей, это улучшает целостность плазматической мембраны сперматозоида, но не влияет на капацитацию, индуцированную *in vitro* [29].

Известно, что существует определенная избирательность в связывании ЭСП со сперматозоидами, зависящая от специфичности сайтов связывания. Так, Zhou и соавт. показали, что экзосомы из придатка семенника имеют определенное сродство к постакросомальной области головки

сперматозоида [30], тогда как экзосомы, полученные из вспомогательных половых желез, будут иметь сродство ко всем доменам клеточной мембраны головки: акросомному гребню, акросоме и постакросоме [20]. Исследователи считают, что экзосомы, которые связываются с головкой сперматозоида, будут влиять на емкость, акросомальную реакцию и способность слияния с ооцитом, тогда как те, которые сливаются со средней и основной частью хвоста, будут оказывать большее влияние на активность митохондрий, энергетический метаболизм и подвижность [31].

В то же время Goericke-Peschab с соавт. продемонстрировали отсутствие положительного эффекта МВ семенной плазмы на качество сперматозоидов собак как при их совместной криоконсервации, так и при добавлении МВ после оттаивания образцов [32]. В контрольных образцах эякулятов МВ удаляли для получения чистой спермы. Проведенные эксперименты показали кратковременное благотворное влияние МВ только на скоростные параметры сперматозоидов после оттаивания по сравнению с группой контроля. Однако этот эффект нивелировался через 30 мин после размораживания. В своих выводах ученые поставили под сомнение целесообразность использования МВ семенной плазмы при криоконсервации с целью повышения качества сперматозоидов собаки после размораживания [32].

Данные, полученные Ferraz с соавт., демонстрируют возможность применения ВВ домашних животных одного вида для успешной криоконсервации образцов спермы редких и исчезающих животных другого вида [33]. Авторами установлено, что ВВ из яйцеводов собак и кошек улучшают состояние сперматозоидов красного волка и гепарда после криоконсервирования. В частности, сперма красного волка и гепарда, размороженная с ВВ из яйцеводов собаки и кошки, имела больше неповрежденных акросом, чем контрольные образцы. Кроме того, сперму красного волка в присутствии ВВ из яйцевода собаки лучше поддерживала подвижность сперматозоидов с течением времени. Однако такого эффекта не наблюдалось в образцах со сперматозоидами гепарда.

Положительный эффект везикул исследователи объясняют тем, что они несут важные для функции сперматозоидов белки, которые улучшают не только подвижность после оттаивания, но увеличивают сохранность акросом спермы красного волка и гепарда *in vitro*. Результаты проведенной работы показывают, что эти ВВ могут быть ценным инструментом для улучшения условий криохранения спермы у видов, находящихся под угрозой исчезновения [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Общепризнанным фактом является то, что сперма разных видов животных обладает разной чувствительностью к криоконсервированию [34]. Успешность криоконсервации сперматозоидов определяется сложным взаимодействием мембраны сперматозоида с семенной плазмой, с разбавителем и подбором приемлемых методов замораживания. Целостность мембраны является очень важной для нормального функционирования сперматозоидов после оттаивания. Потеря поверхностных белков, таких как рецептор прогестерона, особенно из акросомы, может ухудшить качество после оттаивания и оплодотворяющую способность сперматозоида [35]. Следовательно, структурная целостность сперматозоида является необходимым условием для правильного функционирования и оплодотворения ооцитов и последующее эмбриональное развитие организма [36].

Большинство протоколов замораживания спермы млекопитающих включают удаление семенной плазмы перед криоконсервацией с помощью центрифугирования [37], что практически сводит к минимуму защитное действие антиоксидантных ферментов семенной плазмы от окислительного стресса [38].

При этом биосинтетическая способность сперматозоидов ограничена, что служит главным препятствием для их самовосстановления после повреждения [38]. Однако многие внешние факторы контролируют функцию сперматозоидов, действуя через поверхностные и мембранные компоненты, поэтому ряд исследователей выдвинули гипотезу, что использование МСК/микровезикул при криоконсервации спермы может быть эффективным биологическим подходом для повышения фертильности и жизнеспособности сперматозоидов за счет поддержки механизмов репарации посредством секреции различных белков. Но при использовании МСК и ВВ необходимо учитывать, что стволовые клетки и их производные из различных тканей продуцируют вещества с неодинаковой биоактивностью по отношению к клеткам-реципиентам. Поэтому для МСК и ВВ должны быть разработаны стандарты измерений контроля качества и протоколов безопасности, а также эффективности использования для коммерческих целей при искусственном оплодотворении.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00172 в рамках Программы стра-

тегического академического лидерства Казанского федерального университета ПРИОРИТЕТ-2030.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tao Y., Sanger E., Saewu A., Leveille M.-C. 2020. Human sperm vitrification: The state of the art. *Reprod Biol Endocrinol.* **18** (1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00580-5>
2. Ugur M.R., Saber Abdelrahman A., Evans H.C., Gilmore A.A., Hitit M., Arifiantini R.I., Purwantara B., Kaya A., Memili E. 2019. Advances in cryopreservation of bull sperm. *Front. Vet. Sci.* **6**, 268. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
3. Ombelet W., Van Robays J. 2015. Artificial insemination history: Hurdles and milestones. *Facts Views Vis. Obgyn.* **7** (2), 137–143.
4. Saadeldin I.M., Khalil W.A., Alharbi M.G., Lee S.H. 2020. The current trends in using nanoparticles, liposomes, and exosomes for semen cryopreservation. *Animals (Basel).* **10** (12), 2281. <https://doi.org/10.3390/ani10122281>
5. Thongphakdee A., Sukparangsi W., Comizzoli P., Chatdarong K. 2020. Reproductive biology and biotechnologies in wild felids. *Theriogenology.* **150**, 360–373. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.004>
6. Yanez-Ortiz I., Catalan J., Rodriguez-Gil J.E., Miro J., Yeste M. 2022. Advances in sperm cryopreservation in farm animals. Cattle, horse, pig and sheep. *Anim. Reprod. Sci.* **246**, 106904. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>
7. Zakirova E.Y., Shalimov D.V., Garanina E.E., Zhuravleva M.N., Rutland C.S., Rizvanov A.A. 2019. Use of biologically active 3D matrix for extensive skin defect treatment in veterinary practice. *Front. Vet. Sci.* **6**, 76. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00076>
8. Naumenko E., Zakirova E., Guryanov I., Akhatova F., Sergeev M., Valeeva A., Fakhrullin R. 2021. Composite biodegradable polymeric matrix doped with halloysite nanotubes for the repair of bone defects in dogs. *Clays Clay Miner.* **69**, 522–532.
9. Theerakittayakorn K., Thi Nguyen H., Musika J., Kunkanjanawan H., Imsoonthornruksa S., Somrednagan S., Ketudat-Cairns M., Parnpai R. 2020. Differentiation induction of human stem cells for corneal epithelial. *Int. J. Mol. Sci.* **21** (21), 7834. <https://doi.org/10.3390/ijms21217834>
10. Jovic D., Yu Y., Wang D., Wang K., Li H., Xu F., Liu C., Liu J., Luo Y. 2022. A brief overview of global trends in MSC-based cell therapy. *Stem Cell. Rev. Rep.* **18** (5), 1525–1545. <https://doi.org/10.1007/s12015-022-10369-1>
11. Khubutiya M.S., Vagabov A.V., Temnov A.A., Sklifas A.N. 2014. Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mes-

- enchymal stromal cells in models of acute organ injury. *Cytotherapy*. **16**, 579–585.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.07.017>
12. Qamar A.Y., Fang X., Kim M.J., Cho J. 2020. Improved viability and fertility of frozen-thawed dog sperm using adipose-derived mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* **10** (1), 7034.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-61803-8>
 13. Sun J., Shao Z., Yang Y., Wu D., Zhou X., Yuan H. 2012. Annexin 1 protects against apoptosis induced by serum deprivation in transformed rat retinal ganglion cells. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 5543–5551.
<https://doi.org/10.1007/s11033-011-1358-1>
 14. Lennon N.J., Kho A., Bacskai B.J., Perlmutter S.L., Hyman B.T., Brown R.H., Jr. 2003. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J. Biol. Chem.* **278**, 50466–50473.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M307247200>
 15. To W.S., Midwood K.S. 2011. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair*. **4**, 21.
<https://doi.org/10.1186/1755-1536-4-21>
 16. Zakirova E.Y., Aimaletdinov A.M., Malanyeva A.G., Rutland C.S., Rizvanov A.A. 2020. Extracellular vesicles: New perspectives of regenerative and reproductive veterinary medicine. *Front. Vet. Sci.* **7**, 594044.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.594044>
 17. Ratajczak M.Z., Ratajczak J. 2020. Extracellular microvesicles/exosomes: Discovery, disbelief, acceptance, and the future. *Leukemia*. **34** (12), 3126–3135.
<https://doi.org/10.1038/s41375-020-01041-z>
 18. Qamar A.Y., Fang X., Kim M.J., Cho J. 2019. Improved post-thaw quality of canine semen after treatment with exosomes from conditioned medium of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Animals (Basel)*. **9** (11), 865.
<https://doi.org/10.3390/ani9110865>
 19. Mokarizadeh A., Rezvanfar M.A., Dorostkar K., Abdollahi M. 2013. Mesenchymal stem cell derived microvesicles: Trophic shuttles for enhancement of sperm quality parameters. *Reprod. Toxicol.* **42**, 78–84.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.07.024>
 20. Mahiddine F.Y., Qamar A.Y., Kim M.J. 2020. Canine amniotic membrane derived mesenchymal stem cells exosomes addition in canine sperm freezing medium. *J. Animal Reprod. Biotechnol.* **35** (3), 268–272.
<https://doi.org/10.12750/JARB.35.3.268>
 21. Venugopal C., Shamir C., Senthilkumar S., Babu J.V., Sonu P.K., Nishtha K.J., Rai K.S., K S., Dhanushkodi A. 2017. Dosage and passage dependent neuroprotective effects of exosomes derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells: An in vitro analysis. *Curr. Gene Ther.* **17** (5), 379–390.
<https://doi.org/10.2174/1566523218666180125091952>
 22. Агейкин А.В., Горелов А.В., Усенко Д.В., Мельников В.Л. 2021. Экзосомы крови как новые биомаркеры инфекционных заболеваний. *Медицинское обозрение*. **5** (11), 744–748.
<https://doi.org/10.32364/2587-6821-2021-5-11-744-748>
 23. Chen J., Li P., Zhang T., Xu Z., Huang X., et al. 2021. Review on strategies and technologies for exosome isolation and purification. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 811971.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.811971>
 24. Koike C., Zhou K., Takeda Y., Fathy M., Okabe M., Yoshida T., Nakamura Y., Kato Y., Nikaido T. 2014. Characterization of amniotic stem cells. *Cell Reprogram.* **16** (4), 298–305.
<https://doi.org/10.1089/cell.2013.0090>
 25. Kazemnejad S., Khanmohammadi M., Zarnani A-H., Bolouri M.R. 2016. *Characteristics of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane: A potential candidate for stem cell-based therapy. In perinatal tissue-derived stem cells: Alternative sources of fetal stem cells.* Ed: B. Arjmand. Springer International Publishing, p. 137–169.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-46410-7_7
 26. Bosch S., de Beaurepaire L., Allard M., Mosser M., Heichette C., Chrétien D., Jegou D., Bach J.M. 2016. Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryo-damage. *Sci. Rep.* **6**, 36162.
<https://doi.org/10.1038/srep36162>
 27. Сысоева А.П., Макарова Н.П., Краевая Е.Е. 2021. Роль внеклеточных везикул семенной плазмы в изменении морфофункциональных характеристик сперматозоидов человека. *Клин. эксп. морфология*. **10** (4), 5–13.
<https://doi.org/10.31088/CEM2021.10.4.5-13>
 28. Mahdavinezhad F., Sadighi Gilani M.A., Gharaei R., Ashrafnezhad Z., Valipour J., Shabani Nashtaei M., Amidi F. 2022. Protective roles of seminal plasma exosomes and microvesicles during human sperm cryopreservation. *Reprod. Biomed. Online*. **45** (2), 341–353.
 29. Du J., Shen J., Wang Y., Pan C., Pang W., Diao H., Dong W. 2016. Boar seminal plasma exosomes maintain sperm function by infiltrating into the sperm membrane. *Oncotarget*. **7**, 58832–58847.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.11315>
 30. Zhou W., Stanger S.J., Anderson A.L., Bernstein I.R., De Iuliis G.N., McCluskey A., McLaughlin E.A., Dun M.D., Nixon B. 2019. Mechanisms of tethering and cargo transfer during epididymosome-sperm interactions. *BMC Biol.* **17** (1), 35.
<https://doi.org/10.1186/s12915-019-0653-5>
 31. Machtinger R., Laurent L.C., Baccarelli A.A. 2016. Extracellular vesicles: Roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Hum. Reprod. Update*. **22**(2), 182–193.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmv055>
 32. Goericke-Pesch S., Hauck S., Failing K., Wehrend A. 2015. Effect of seminal plasma vesicular structures in canine frozen-thawed semen. *Theriogenology*. **84**, 1490–1498.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.033>
 33. de Almeida Monteiro Melo Ferraz M., Nagashima J.B., Noonan M.J., Crosier A.E., Songsasen N. 2020. Oviductal extracellular vesicles improve post-thaw sperm function in red wolves and cheetahs. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(10), 3733.
<https://doi.org/10.3390/ijms21103733>
 34. Bencharif D., Dordas-Perpinya M. 2020. Canine semen cryoconservation: Emerging data over the last

- 20 years. *Reproduction in Domestic Animals*. **55** (2), 61. <https://doi.org/10.1111/rda.13629>
35. Cheng F.P., Wu J.T., Tsai P.S., Chang C.L., Lee S.L., et al. 2005. Effects of cryo-injury on progesterone receptor[s] of canine spermatozoa and its response to progesterone. *Theriogenology*. **64** (4), 844–854. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.10.021>
36. Liu S., Li F. 2020. Cryopreservation of single-sperm: Where are we today? *Reprod. Biol. Endocrinol.* **18** (1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00607-x>
37. de Oliveira R.A., Wolf C.A., de Oliveira Viu M.A., Gambarini M.L. 2013. Addition of glutathione to an extender for frozen equine semen. *Equine J. Vet.* **33**, 1148–1152. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.05.001>
38. Peris-Frau P., Soler A.J., Iniasta-Cuerda M., Martín-Maestro A., Sánchez-Ajofrín I., Medina-Chávez D.A., Fernández-Santos M.R., García-Álvarez O., Maroto-Morales A., Montoro V., Garde J.J. 2020. Sperm cryo-damage in ruminants: Understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. *Int. Journal Mol. Sci.* **21** (8), 2781. <https://doi.org/10.3390/ijms21082781>

Modern Trends of the Application of Stem Cells and Their Derivatives during Cryopreservation of Animal Sperm

M. A. Tambovsky¹*, A. M. Aimaletdinov¹, E. Yu. Zakirova¹

¹*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

*e-mail: maxim.tambovsky.kfu@gmail.com

Cryopreservation is an important method for preserving sperm from various organisms. However, freezing gametes often leads to various types of cell damage, which affects the outcome of artificial insemination. After thawing, spermatozoa usually have ultrastructural, biochemical and functional changes such as cell membrane and chromatin damage and oxidative stress. Since spermatozoa have limited biosynthetic capacity, they have a low capacity to regenerate. The current trend is to improve the sperm cryopreservation regime using natural extracellular vesicles and stem cells. Extracellular vesicles and stem cells have a potential regenerative effect, as they contain various biologically active molecules affecting sperm repair. This review focuses on current strategies to improve sperm health after cryopreservation. In particular, this review describes the results of studies on the use of extracellular vesicles and stem cells as cryoprotectors during freezing and thawing of spermatozoa.

Keywords: cryoconservation, cryodamage, spermatozoa, extracellular vesicles, stem cells