

Воспроизводство

Рубрика

doi.org/10.31043/2410-2733-2023-1-89-95

УДК: 611.013.395.018.1:636.082.453.52/.53

В. С. Семенова, М. М. Ивановская, А. Д. Шушакова, Е. А. Корочкина

Влияние мезенхимальных стволовых клеток и их производных на качественные показатели спермы животных до и после криоконсервации (обзор)

Аннотация.

При криоконсервации спермы происходит повреждение сперматозоидов вследствие осмотического стресса, что влечет за собой отклонения в ДНК и деформацию хвоста сперматозоида. Для минимизации деструктивных изменений в клетках применяют антиоксиданты или криопротекторные среды, дополненные питательными компонентами. Многочисленными исследованиями установлено, что использование мезенхимальных стволовых клеток и их секретов увеличивает процент жизнеспособных и подвижных сперматозоидов. Также многие из растворимых секреторных факторов мезенхимальных стволовых клеток могут находиться во внеклеточных везикулах и действовать как медиаторы многих паракринных действий мезенхимальных стволовых клеток. Они играют роль транспортных средств для вытеснения нежелательных клеточных белков, но данные разных авторов продемонстрировали их потенциальную роль во многих биологических процессах, включая вклад в регенерацию клеток, выживание и изменение фенотипа клеток-реципиентов. Прикрепление или интернализация микровезикул в клетках-мишенях вызывает широкий спектр эпигенетических и фенотипических изменений в клетках-реципиентах, таких как изменение жизнеспособности клеток-реципиентов, их адгезионных свойств и чувствительности или устойчивости к определенным факторам окружающей среды. Специфическое нацеливание на сперматозоиды с помощью микровезикул может рассматриваться как эффективный биологический подход для поддержания и повышения качества сперматозоидов, в перспективе способно улучшать их жизнеспособность и параметры прогрессивной подвижности после криоконсервации. Широкий терапевтический эффект мезенхимальных стволовых клеток и секретируемых ими биологически активных веществ требует дальнейших исследований для включения в протоколы заморозки спермы с целью преодоления существующих ограничений, связанных с их применением, и выяснения точных механизмов их действия. Дальнейшие эксперименты, в частности анализы *in vivo*, необходимы для подтверждения фактического клинического воздействия этих химических веществ на оплодотворяющую способность сперматозоида. Таким образом, в данном обзоре был освещен вопрос проводимых исследований в области применения мезенхимальных стволовых клеток и секретируемых ими веществ при криоконсервации спермы животных.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, криоконсервация, сперма животных.

Авторы:

Семенова Валерия Сергеевна – аспирант; e-mail: semenova.ler@yandex.ru;

Шушакова Анна Дмитриевна – студент; e-mail: anna.shusha00@yandex.ru;

Ивановская Милена Муслимовна – e-mail: mmi@cytogentest.ru;

Корочкина Елена Александровна – кандидат ветеринарных наук; e-mail: e.kora@mail.ru.

Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины; 196084, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская 5.

Андрология — это наука, изучающая анатомические и физиологические аспекты функционирования половой системы самцов, заболевания, связанные с нарушением ее деятельности, а также методы лечения и профилактики. В ветеринарной андрологии особое внимание уделяется проблемам качества спермы: отечественными

учеными установлено, что 14,0-35,0% производителей выбраковываются из-за ее неудовлетворительных показателей. За последние несколько лет в данной области было проведено большое количество исследований, направленных на улучшение качества спермы, лечения бесплодия и разработку наиболее эффективных методов те-

рации при возникновении заболеваний. Перспективным направлением является использование мезенхимальных стволовых клеток, а также продуктов их секреции в качестве дополнения (добавки) к криозащитной среде. Определенный интерес вызывает способность мезенхимальных стволовых клеток (далее — МСК) влиять на репродуктивную систему самцов и на сохранность сперматозоидов после криоконсервации.

Как известно, криоконсервация спермы широко используется в качестве вспомогательной репродуктивной технологии в разведении разных видов домашних и сельскохозяйственных животных. Длительное хранение спермы самцов-производителей эффективно для разведения животных с точки зрения планирования времени искусственного осеменения, подходящего самке, подбора производителей и профилактики заболеваний половых путей. Тем не менее криоконсервация может оказывать разрушительное воздействие на сперматозоиды на структурном и молекулярном уровнях, приводя к повреждению ДНК, снижению жизнеспособности, подвижности сперматозоидов и оплодотворяющей способности замороженных-оттаянных сперматозоидов [1-5]. Результаты многочисленных исследований указывают на ухудшение качества спермы после оттаивания. При этом наблюдается увеличение числа сперматозоидов с поврежденной ДНК, нарушением морфологической структуры (дефекты хвоста) и апоптозоподобными изменениями [6].

Снижение качества спермы в процессе криоконсервации приводит к полной или частичной потере оплодотворяющего потенциала сперматозоидов. Во время криоконсервации резкое снижение температуры вызывает патологические изменения в функции и морфологии сперматозоидов [7]. Причина данного явления — осмотический стресс, вызванный образованием кристаллов льда [8], что дополнительно способствует продукции АФК (активных форм кислорода), повреждению мембраны и утрате внутриклеточного содержимого [6; 9]. К негативным последствиям криоконсервации относят, в основном, снижение подвижности, жизнеспособности и оплодотворяющей способности спермы [10].

В процессе криоконсервации спермы функции сперматозоидов нарушаются, что может снижать их оплодотворяющую способность и эффективность осеменения в целом. По мнению некоторых авторов, первично или вторично поврежденные сперматозоиды необходимо регенерировать и восстанавливать для улучшения их способности к оплодотворению.

Современные защитные подходы к таким повреждающим эффектам в основном сосредоточены

на использовании различных разбавителей или криопротекторных сред, дополненных питательными и антиоксидантными компонентами [1-2; 11]. Анализ результатов исследований в области криоконсервации спермы указывает на повышенный интерес к изучению влияния МСК и секретируемых ими веществ на качественные показатели спермы [3-4; 6; 11].

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) представляют собой мультипотентные стволовые клетки, участвующие в восстановлении поврежденных органов и тканей взрослого организма за счет своей способности к самообновлению и дифференцировке в клетки различных типов [12-13]. В последние десятилетия клеточная терапия с использованием МСК получила широкое распространение при лечении целого ряда заболеваний (остеоартроз, рассеянный склероз, инфаркт миокарда, кардиомиопатия, болезнь трансплантат против хозяина и многих других), а также в реабилитации. Основными источниками для выделения МСК для практического применения являются жировая ткань и костный мозг. Свойства биологически активных веществ МСК и их воздействие на клетки послужили поводом для исследований, направленных на использование МСК в качестве криопротекторов спермы.

Использование МСК во время криоконсервации спермы может быть эффективным биологическим подходом к повышению жизнеспособности сперматозоидов за счет поддержки механизмов репарации посредством секреции необходимых белков. Эксперимент, направленный на подтверждение данного предположения, проводился в 2020 году группой ученых Национального университета Чуннам. При добавлении МСК в среду для заморозки спермы собак исследователи отмечали повышенную выживаемость сперматозоидов после криоконсервирования по сравнению с образцами сперматозоидов с добавлением базовых разбавителей. При этом обнаруженные в экспериментальных образцах методом вестерн-блот белки, такие как аннексин, дисферлин и фибронектин, оказывали влияние на механизмы репарации плазматической мембраны сперматозоидов собак на клеточном уровне [2; 10].

В пользу данного утверждения свидетельствуют результаты еще одного исследования, направленного на изучение применения МСК при снижении качественных показателей спермы. Было установлено статистически достоверное увеличение жизнеспособности сперматозоидов и улучшение их подвижности по сравнению с контролем при введении МСК в семенники крыс

при некоторых патологиях, вызывающих снижение данных показателей спермы [14]. Авторы предполагают, что МСК путем воздействия на сигнальный путь Akt и увеличения экспрессии киназы гликогенсинтазы-3 приводят к продукции АТФ. Также в сперме исследуемых животных, в семенники которых были введены МСК, идентифицировался F-актин, чего не было обнаружено в контрольном образце [15]. Эта же исследовательская группа ранее показала, что фактор стволовых клеток (SCF), секретируемый МСК, играет роль в стимулировании сперматогенеза у реципиентов [16].

Согласно результатам проведенных исследований, мезенхимальные стволовые клетки, полученные из жировой ткани быка, а также продукты их секреции оказывают положительное влияние на двигательную способность сперматозоидов быка и их морфологическую целостность после оттаивания. Вероятно, данные результаты связаны с механизмом действия секретируемых МСК веществ.

В таблице № 1 приведены основные факторы, секретируемые МСК, которые могут играть важную роль в защите сперматозоидов от криоповреждения.

Многочисленные исследования демонстрируют, что благоприятный эффект применения МСК связан не с дифференцировкой МСК, а именно с их способностью к секреции большого спектра биологически активных веществ: факто-

ров роста, цитокинов и внеклеточных везикул (микровезикулы и экзосомы) [24]. Внеклеточные везикулы содержат функциональные молекулы, такие как микро-РНК, мРНК, ДНК, липиды и белки. При прикреплении к клеткам-реципиентам они интернализуются, что приводит к широкому спектру эпигенетических и фенотипических модификаций клетки-реципиента. Эти изменения влияют на жизнеспособность клеток-реципиентов, их адгезию, устойчивость к факторам окружающей среды и регенеративную способность [3]. В недавних опытах было обнаружено, что факторы роста, полученные из мезенхимальных стволовых клеток, являются мощными индукторами регенерации клеток. Данные исследований показывают, что многие из растворимых секреторных факторов МСК могут находиться во внеклеточных везикулах и действовать как медиаторы многих паракринных действий МСК [11]. Внеклеточные везикулы делятся, в основном, на два типа: экзосомы и микровезикулы, они отличаются размером и процессом внутриклеточного образования.

Микровезикулы (МВ) представляют собой некрупные мембранные пузырьки, высвобождающиеся из клеток и служащие челноками для биоактивного компонента клеток при паракринном воздействии. Они играют роль транспортных средств для вытеснения нежелательных клеточных белков. Данные разных авторов продемонстрировали их потенциальную роль во многих биологических процессах, включая вклад в реге-

Таблица 1. Секретируемые МСК биологически активные вещества, влияющие на изменение качества спермы

Факторы, секретируемые МСК [17]	Предполагаемое участие в изменении качества спермы
Фактор роста фибробластов (bFGF) [18]	Ключевая роль в регулировании роста и развития некоторых репродуктивных органов, включая семенник
Фактор роста кератиноцитов (KGF)	Рост и дифференцировка клеток в семеннике [19]
Стромальный фактор-1 (SDF-1)	Действует на первичные половые клетки, поддерживает их выживаемость
Моноцитарный хемотаксический белок-1 (MCP-1)	Участвует в регуляции большой популяции макрофагов семенников
Инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1)	Снижает апоптоз клеток [20]
Трансформирующий фактор роста-β (TGF-β)	Передача сигналов в клетке [21]
Тромбоцитарный фактор роста (PDGF)	Участие в производстве тестостерона и дифференцировке клеток Лейдига [22]
Интерлейкин-8 (IL-8)	Маркер воспаления половых путей самца
Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) [18]	Регулирует пролиферацию половых клеток и способствует регенерации семенников за счет усиления васкуляризации
Глиальный нейротрофический фактор (GDNF)	Паракринный фактор, который способствует самообновлению сперматогонимальных стволовых клеток [23]

нерацию клеток, выживание и изменение фенотипа клеток-реципиентов [11]. Прикрепление или интернализация МВ в клетках-мишенях вызывает широкий спектр эпигенетических и фенотипических изменений в клетках-реципиентах, таких как изменение жизнеспособности клеток-реципиентов, их адгезионных свойств и чувствительности или устойчивости к определенным факторам окружающей среды [3]. Специфическое нацеливание на сперматозоиды с помощью МВ может рассматриваться как эффективный биологический подход для поддержания и повышения качества сперматозоидов, в перспективе способно улучшать их жизнеспособность и параметры прогрессивной подвижности после криоконсервации [11].

Разные данные указывают на то, что секретлируемые микровезикулы из мезенхимальных стволовых клеток участвуют в регенерации поврежденных эндогенных клеток посредством перемещения трофических молекул МСК [3]. Использование МВ в процессе криоконсервации имеет положительное значение на сперматогенез. МВ не вызывают увеличения плотности клеток в отличие от использования цельных МСК [11], а также опосредованно повышают порог устойчивости сперматозоидов к деструктивным изменениям и тем самым незначительно снижают процент некроза сперматозоидов [3-4]. Также МВ безопасны в долгосрочной перспективе, поскольку естественным образом присутствуют в биожидкостях животного, но при необходимости могут быть применены для тканеспецифических транспортировок, таких как транспорт соединений в гаметы и эмбрионы для повышения репродуктивного успеха.

Немаловажно исследование группы ученых из Акронского университета, показавшее, что параметры жизнеспособности и подвижности сперматозоидов после криоконсервации значительно улучшаются при использовании МВ. Так, сперматозоиды, полученные из придатков хвоста взрослых самцов крыс линии Вистар, были в равной степени разделены на четыре группы.

После получения сперму разбавляли повышающимися концентрациями МВ, происходящих из МСК (25, 50 и 100 мкг), без добавления других криопротекторных сред. Затем сперму подвергали криоконсервации. Замороженно-размороженные сперматозоиды оценивали по параметрам жизнеспособности, подвижности и антиоксидантной способности. Результаты указали на улучшение качества спермы и, как следствие, на потенциальную трофическую роль МВ, происходящих из МСК, по отношению к сперматозоидам [19].

Возможности аллогенного и ксеногенного применения являются еще одним существенным преимуществом МВ [3]. Опосредованная вставка рецепторов фактора роста может быть еще одним возможным механизмом, приводящим к повышенной чувствительности сперматозоидов к паракринным факторам роста. В соответствии с результатами, полученными в других исследованиях, четко наблюдается очевидный антиапоптотический эффект МВ, происходящих из МСК, в отношении замороженных-оттаянных сперматозоидов [3]. Дальнейшие эксперименты, в частности анализы *in vivo*, необходимы для подтверждения фактического клинического воздействия этих химических веществ на оплодотворяющую способность сперматозоидов.

Помимо этого, необходимы дальнейшие исследования *in vivo/in vitro* для выяснения точного механизма терапевтического действия МВ при повреждении зародышевых клеток и их возможного взаимодействия с токсическими стрессовыми состояниями.

Таким образом, на основании представленной информации можно сделать вывод, что МСК, происходящие из них МВ и секретлируемые МСК вещества обладают необходимыми свойствами для улучшения качества спермы как до, так и после криоконсервации, хотя данное заключение до сих пор нуждается в подтверждении большим количеством экспериментов.

Литература

1. Киреев, И. В. Антиоксиданты в ветеринарии : монография / И. В. Киреев, В. А. Оробец. — Ставрополь : СтГАУ, 2019. — 132 с.
2. Noei Razliqi R. Protective role of glutathione in buck semen cryopreservation / Noei R. Razliqi, M. Zhandi et al. // Iran J Vet Res. — 2015. — № 16(3). — P. 298-300.
3. Mokarizadeh A. Mesenchymal stem cell derived microvesicles: trophic shuttles for enhancement of sperm quality parameters / A. Mokarizadeh, M. A. Rezvanfar // Reprod Toxicol. — 2013. — № 42. — P. 78-84. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.07.024.
4. Qamar A. Y. The effect of astaxanthin supplementation on the post-thaw quality of dog semen / A. Y. Qamar, X. Fang et al. // Reprod Domest Anim. — 2020. — № 55(9). — P. 1163-1171. doi: 10.1111/rda.13758.

5. Galipeau J. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities / J. Galipeau, L. Sensebe // *Cell Stem Cell*. — 2018. — № 22(6). — P. 824-833. doi: 10.1016/j.stem.2018.05.004.
6. Rizkallah N. Factors Affecting the Survival of Ram Spermatozoa during Liquid Storage and Options for Improvement / N. Rizkallah, C. G. Chambers et al. // *Animals (Basel)*. — 2022. — № 12(3). — P. 244. doi: 10.3390/ani12030244.
7. Nijs M. Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa / M. Nijs, E. Creemers et al. // *Reprod Biomed Online*. — 2009. — № 19. — P. 202-206. doi: 10.1016/S1472-6483(10)60073-9.
8. Oldenhof H. et al. Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: Mode of action of cryoprotective agents / H. Oldenhof et al. // *Biol. Reprod.* — 2013. — Vol. 88. — № 3.
9. Tiwari S. Targeted antioxidant delivery modulates mitochondrial functions, ameliorates oxidative stress and preserve sperm quality during cryopreservation / S. Tiwari, R. K. Dewry et al. // *Theriogenology*. — 2022. — № 179. — P. 22-31. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.11.013.
10. Mahiddine F. Y. Overview on the Antioxidants, Egg Yolk Alternatives, and Mesenchymal Stem Cells and Derivatives Used in Canine Sperm Cryopreservation / F. Y. Mahiddine, M. J. Kim // *Animals (Basel)*. — 2021. — № 11(7). — P. 1930. doi:10.3390/ani11071930.
11. Qamar Ahmad. Improved viability and fertility of frozen-thawed dog sperm using adipose-derived mesenchymal stem cells / Qamar Ahmad, Fang Xun, Kim Min Jung, Cho Jongki // *Scientific Reports*. — 2020. — № 10. doi: 10.1038/s41598-020-61803-8.
12. Liu Tong Ming. Stemness of Mesenchymal Stem Cells / Liu Tong Ming // *Journal of Stem Cell Therapy and Transplantation*. — 2017. — № 1. — P. 071-073. doi: 10.29328/journal.jsctt.1001008.
13. Tamadon Amin, Zhan-byrbekuly Ulanbek et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy of Male Infertility. — 2019. doi: 10.5772/intechopen.88343.
14. P. Sharifian. Conditioned medium of bone marrow mesenchymal stem cells improves sperm parameters and reduces histological alteration in rat testicular ischaemia/reperfusion model / P. Sharifian, S. Yari, P. Hasanein, Y. M. Nezhad // *Andrologia*. — 2022. — e14624. doi: 10.1111/and.14624.
15. Hsiao C. H. Mesenchymal stem cells restore the sperm motility from testicular torsion-detorsion injury by regulation of glucose metabolism in sperm / C. H. Hsiao et al. // *Stem Cell Res. — Ther.* 2019. — Vol. 10. — № 1. — P. 1-10. doi: 10.1186/s13287-019-1351-5.
16. Hsiao C. H. Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury / Hsiao C. H. et al. // *Stem Cell Res. Ther.* — 2015. — Vol. 6. — № 1. — P. 1-12. doi: 10.1186/s13287-015-0079-0.
17. Sagaradze G. D. Participation of the secretary of mesenchymal stromal cells in the restoration of spermatogenesis. The dissertation for the degree of candidate of biological sciences, Moscow, 2019.
18. Iwase T. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia / T. Iwase, N. Nagaya et al. // *Cardiovascular Research*. — 2005. — № 3 (66). — P. 543-551. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.02.006.
19. Solek P. Trade-offs between male fertility reduction and selected growth factors or the klotho response in a lipopolysaccharide-dependent mouse model / P. Solek, J. Mytych et al. *Toxicol Res.* — 2021. — № 38(2). — P. 175-186. doi: 10.1007/s43188-021-00098-x.
20. Yao J. The effects of IGF-1 on mouse spermatogenesis using an organ culture method / J. Yao, H. Zuo, J. Gao, M. Wang, D. Wang, X. Li // *Biochem Biophys Res Commun*. — 2017. — № 491(3). — 840-847. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.125.
21. Fan Y. S. TGF- β superfamily: how does it regulate testis development / Y. S. Fan, Y. J. Hu, W. X. Yang // *MolBiolRep.* — 2012. — № 39(4). — 4727-4741. doi: 10.1007/s11033-011-1265-5.
22. Wang Y. Platelet-derived growth factor BB stimulates differentiation of rat immature Leydig cells / Y. Wang, X. Li et al. // *J Mol Endocrinol*. — 2018. — № 60(1). — P. 29-43. doi: 10.1530/JME-17-0222.
23. Chen X. The roles of microRNAs in regulation of mammalian spermatogenesis / X. Chen, X. Li, J. Guo, P. Zhang, W. Zeng // *J Anim Sci Biotechnol*. — 2017. — 8:35. doi: 10.1186/s40104-017-0166-4.
24. Qamar A. Y. Improved post-thaw quality of canine semen after treatment with exosomes from conditioned medium of adipose-derived mesenchymal stem cells / A. Y. Qamar, X. Fang, M. J. Kim, J. Cho // *Animals (Basel)*. — 2019. — № 9 (11). — P. 865. doi: 10.3390/ani9110865.

Semenova V., Ivanovskaya M., Shushakova A., Korochkina E.

The influence of mesenchymal stem cells and its derivatives on the qualitative indicators of animal sperm before and after cryopreservation (review)

Abstract.

During sperm cryopreservation, sperm damage occurs due to osmotic stress, which entails deviations into the DNA and deformation of the tail of a sperm. To minimize destructive changes in cells, antioxidants or cryoprotective media supplemented with nutrient components are used. Numerous studies have established that the use of mesenchymal stem cells and their secret increases the percentage of viable and mobile sperm. Also, many of the soluble secretory factors of mesenchymal stem cells can be in extracellular vesicles and act as mediators of many paracrine actions of mesenchymal stem cells. They play the role of vehicles to displace unwanted cellular proteins, but the data of different authors demonstrated their potential role in many biological processes, including contribution to cell regeneration, survival and change in the phenotype of recipient cells. The attachment or internalization of microvesicles in target cells causes a wide range of epigenetic and phenotypic changes in recipient cells, such as a change in the viability of recipient cells, their adhesive properties and sensitivity or resistance to certain environmental factors. Spermatozoa using microvesicles can be considered as an effective biological approach to maintaining and improving the quality of sperm, in the future, it can improve their viability and progressive mobility after cryopreservation. The wide therapeutic effect of mesenchymal stem cells and biologically active substances secreted by them requires further research to include sperm freezing in the protocols in order to overcome existing restrictions related to their use, and to clarify the exact mechanisms of their action. Further experiments, in particular in vivo, are necessary to confirm the actual clinical effects of these chemicals on the fertilizing ability of a spermatozoa. Thus, in this review, the issue of conducted studies in the field of use of mesenchymal stem cells and the substances they secrete during cryopreservation of animal sperm was covered.

Key words: Mesenchymal stem cells, cryopreservation, animal sperm.

Authors:

Semenova V. – graduate student; e-mail: semenova.ler@yandex.ru;

Shushakova A. – student; e-mail: Anna.shusha00@yandex.ru;

Ivanovskaya M. – e-mail: mmi@cytogentest.ru;

Korochkina E. – PhD (Vet. Sci.); e-mail: e.kora@mail.ru.

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine; 196084, Russia, St. Petersburg, st. Chernihiv 5.

References

1. Kireev I. V. Antioxidants in veterinary medicine: monograph / I. V. Kireev, V. A. Orobets. — Stavropol: STGAU, 2019. — 132 p.
2. Noei Razliqi R. Protective role of glutathione in buck semen cryopreservation / Noei R. Razliqi, M. Zhandi et al. // Iran J Vet Res. — 2015. — № 16(3). — P. 298-300.
3. Mokarizadeh A. Mesenchymal stem cell derived microvesicles: trophic shuttles for enhancement of sperm quality parameters / A. Mokarizadeh, M. A. Rezvanfar // Reprod Toxicol. — 2013. — № 42. — P. 78-84. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.07.024.
4. Qamar A. Y. The effect of astaxanthin supplementation on the post-thaw quality of dog semen / A. Y. Qamar, X. Fang et al. // Reprod Domest Anim. — 2020. — № 55(9). — P. 1163-1171. doi: 10.1111/rda.13758.
5. Galipeau J. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities / J. Galipeau, L. Sensebe // Cell Stem Cell. — 2018. — № 22(6). — P. 824-833. doi: 10.1016/j.stem.2018.05.004.
6. Rizkallah N. Factors Affecting the Survival of Ram Spermatozoa during Liquid Storage and Options for Improvement / N. Rizkallah, C. G. Chambers et al. // Animals (Basel). — 2022. — № 12(3). — P. 244. doi: 10.3390/ani12030244.

7. Nijs M. Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa / M. Nijs, E. Creemers et al. // *Reprod Biomed Online*. — 2009. — № 19. — P. 202-206. doi: 10.1016/S1472-6483(10)60073-9.
8. Oldenhof H. et al. Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: Mode of action of cryoprotective agents / H. Oldenhof et al. // *Biol. Reprod.* — 2013. — Vol. 88. — № 3.
9. Tiwari S. Targeted antioxidant delivery modulates mitochondrial functions, ameliorates oxidative stress and preserve sperm quality during cryopreservation / S. Tiwari, R. K. Dewry et al. // *Theriogenology*. — 2022. — № 179. — P. 22-31. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.11.013.
10. Mahiddine F. Y. Overview on the Antioxidants, Egg Yolk Alternatives, and Mesenchymal Stem Cells and Derivatives Used in Canine Sperm Cryopreservation / F. Y. Mahiddine, M. J. Kim // *Animals (Basel)*. — 2021. — № 11(7). — P. 1930. doi:10.3390/ani11071930.
11. Qamar Ahmad. Improved viability and fertility of frozen-thawed dog sperm using adipose-derived mesenchymal stem cells / Qamar Ahmad, Fang Xun, Kim Min Jung, Cho Jongki // *Scientific Reports*. — 2020. — № 10. doi: 10.1038/s41598-020-61803-8.
12. Liu Tong Ming. Stemness of Mesenchymal Stem Cells / Liu Tong Ming // *Journal of Stem Cell Therapy and Transplantation*. — 2017. — № 1. — P. 071-073. doi: 10.29328/journal.jscett.1001008.
13. Tamadon Amin, Zhan-byrbekuly Ulanbek et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy of Male Infertility. — 2019. doi: 10.5772/intechopen.88343.
14. Sharifian P. Conditioned medium of bone marrow mesenchymal stem cells improves sperm parameters and reduces histological alteration in rat testicular ischaemia/reperfusion model / P. Sharifian, S. Yari, P. Hasanein, Y. M. Nezhad // *Andrologia*. — 2022. — e14624. doi: 10.1111/and.14624.
15. Hsiao C. H. Mesenchymal stem cells restore the sperm motility from testicular torsion-detorsion injury by regulation of glucose metabolism in sperm / C. H. Hsiao et al. // *Stem Cell Res. — Ther.* 2019. — Vol. 10. — № 1. — P. 1-10. doi: 10.1016/s13287-019-1351-5.
16. Hsiao C. H. Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury / Hsiao C. H. et al. // *Stem Cell Res. Ther.* — 2015. — Vol. 6. — № 1. — P. 1-12. doi: 10.1016/s13287-015-0079-0.
17. Сагарадзе Г. Д. Участие секрета мезенхимальных стромальных клеток в восстановлении сперматогенеза. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Москва, 2019 г.
18. Iwase T. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia / T. Iwase, N. Nagaya et al. // *Cardiovascular Research*. — 2005. — № 3 (66). — P. 543-551. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.02.006.
19. Solek P. Trade-offs between male fertility reduction and selected growth factors or the klotho response in a lipopolysaccharide-dependent mouse model / P. Solek, J. Mytych et al. *Toxicol Res.* — 2021. — № 38(2). — P. 175-186. doi: 10.1007/s43188-021-00098-x.
20. Yao J. The effects of IGF-1 on mouse spermatogenesis using an organ culture method / J. Yao, H. Zuo, J. Gao, M. Wang, D. Wang, X. Li // *Biochem Biophys Res Commun*. — 2017. — № 491(3). — 840-847. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.125.
21. Fan Y. S. TGF- β superfamily: how does it regulate testis development / Y. S. Fan, Y. J. Hu, W. X. Yang // *MolBiolRep.* — 2012. — № 39(4). — 4727-4741. doi: 10.1007/s11033-011-1265-5.
22. Wang Y. Platelet-derived growth factor BB stimulates differentiation of rat immature Leydig cells / Y. Wang, X. Li et al. // *J Mol Endocrinol.* — 2018. — № 60(1). — P. 29-43. doi: 10.1530/JME-17-0222.
23. Chen X. The roles of microRNAs in regulation of mammalian spermatogenesis / X. Chen, X. Li, J. Guo, P. Zhang, W. Zeng // *J Anim Sci Biotechnol.* — 2017. — 8:35. doi: 10.1186/s40104-017-0166-4.
24. Qamar A. Y. Improved post-thaw quality of canine semen after treatment with exosomes from conditioned medium of adipose-derived mesenchymal stem cells / A. Y. Qamar, X. Fang, M. J. Kim, J. Cho // *Animals (Basel)*. — 2019. — № 9 (11). — P. 865. doi: 10.3390/ani9110865.