

Восстановление нарушенного сперматогенеза после интратестикулярной трансплантации ткани неонатального яичка

В.И. Кирпатовский¹, Г.Ю. Кудрявцев², Л.В. Кудрявцева², Е.В. Фролова³

¹ НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А.Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава РФ

² Медицинский институт РУДН

³ ВИНТИ РАН

Сведения об авторах:

Кирпатовский В.И. – д.м.н., профессор, гл. научный сотрудник НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А.Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, e-mail: vladkirp@yandex.ru

Kirpatovskiy V.I. – Dr. Sc., professor, chief scientific researcher of N.A. Lopatkin Scientific Research Institute of Urology and Interventional Radiology – Branch of the National Medical Research Centre of Radiology of the Ministry of Health of Russian Federation, e-mail: vladkirp@yandex.ru

Кудрявцев Г.Ю. – ассистент кафедры патологической анатомии Медицинского института РУДН, e-mail: kudryavtsev_gyu@pfur.ru

Kudryavtsev G.Yu. – Assistant of the Department of Pathological Anatomy of the Medical Institute of the RUDN University, e-mail: kudryavtsev_gyu@pfur.ru

Кудрявцева Л.В. – ассистент кафедры патологической анатомии Медицинского института РУДН, e-mail: kudryavtseva_lv@pfur.ru

Kudryavtseva L.V. – Assistant of the Department of Pathological Anatomy of the Medical Institute of the RUDN University, e-mail: kudryavtseva_lv@pfur.ru

Фролова Е.В. – научный сотрудник ВИНТИ РАН

Frolova E.V. – Researcher VINITI RAS

Проблема мужской infertility остается чрезвычайно актуальной уже в течение десятилетий, несмотря на достижения в области диагностики причин бесплодия, современной фармакологии и клеточных технологий. Последнее направление представляется весьма перспективным, поскольку современные научные данные свидетельствуют, что трансплантация культивированных клеток с высоким пролиферативным потенциалом (стволовых, прогениторных) различного происхождения (мезенхимных клеток костного мозга, жировой ткани, пупочного канатика, предшественников клеток Лейдига и сперматогонияльных клеток) позволяет стимулировать регенерацию и функциональную активность поврежденных тканевых структур [1-5]. Терапевтический эффект во многом связан с действием комплекса факторов роста и цитокинов, секретируемых пересаженными клетками. Более того, показано, что использование продуктов секреции мезенхимных стволовых клеток для стимуляции нарушенного сперматогенеза по эффективности сопоставимо с эффектом трансплантации культуры этих клеток [6].

Для достижения длительного терапевтического эффекта необходимо сохранение жизнеспособности и функциональной активности пересаженных клеток в чужеродной для них зоне за счет воспроизведения благоприятного микроокружения [7-9]. С этой целью используют различные препараты коллагена, а также бесклеточные матриксы, создающие «ниши» для пересаженных клеток [10,11]. Но наиболее оптимальным является микроокружение собственного органа. Нами ранее было показано, что при трансплантации фрагментов ткани неонатального яичка, богатой низкодифференцированными стволовыми/прогениторными клетками под капсулу почки, происходит стойкое их приживание с формированием типичных органных структур – канальцев, высланных сперматогенным эпителием, интерстициальных клеток Лейдига, придатка яичка и семявыносящего протока [12]. Все это свидетельствует о кооперативном взаимодействии клеток, пересаженных в составе тканевого трансплантата.

Учитывая эти данные, мы провели исследование на крысах для изучения возможности восстановления нарушенного сперматогенеза при пересадке ткани неонатального

яичка под белочную оболочку яичка в модели абдоминального крипторхизма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проведены на 20 белых беспородных крысах-самцах массой 250-280 г. Все эксперименты выполнялись в соответствии с требованиями Хельсингского соглашения о гуманном обращении с животными.

У 16 крыс с целью нарушения сперматогенеза предварительно моделировали абдоминальную форму крипторхизма, перемещая оба яичка из мошонки через паховый канал в брюшную полость и фиксируя их лигатурой к боковой стенке. Через 2 недели яичко возвращали обратно в мошонку. При этом в контрольной серии (1-я серия, 8 крыс) никаких манипуляций не проводили, а в опытной серии (2-я серия 8 крыс) производили трансплантацию тестикулярной ткани, полученной от новорожденных крысят (1-2 суток после рождения), под белочную оболочку яичка. У 4 крыс никаких вмешательств не производили. Они служили контролем для получения нормальных значений изучаемых показателей. ■

Метод трансплантации под белочную оболочку яичка был выбран в связи с иммунопривилегированностью этой зоны вследствие наличия гематотестикулярного барьера, что позволяет приживать генетически чужеродным тканям и клеткам. Методика трансплантации заключалась в надсечении белочной оболочки яичка в бессосудистой зоне, формировании с помощью микрохирургического зонда под белочной оболочкой тоннеля и помещении в него фрагмента неонатальной тестикулярной ткани с последующим ушиванием разреза оболочки яичка.

Животных обследовали через 1 и 3 месяца после низведения яичка. В эти сроки брали пробы крови для определения уровня тестостерона в крови, удаляли яички, определяли их массу взвешиванием и брали пробы ткани из области трансплантации для гистологического и морфометрического исследования. Концентрацию тестостерона в сыворотке крови определяли иммунохемилюминесцентным методом на иммунохимическом анализаторе Access 2 (Beckman Coulter, США). Гистологическое исследование проводили по стандартной методике с окрашиванием парафиновых срезов гематоксилином и эозином.

Статистическую обработку цифровых данных проводили по методу Стьюдента с использованием критерия достоверности *t*. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех экспериментах через 2 недели после перемещения яичек в брюшную полость развивалась их выраженная гипотрофия. Масса органа уменьшалась с $1,87 \pm 0,03$ г до $0,79 \pm 0,02$ г ($p < 0,001$). В контрольной серии (без трансплантации) через 1 и 3 месяца после низведения яичек в мошонку их масса возрастала незначительно, но статистически достоверно – до $0,92 \pm 0,03$ и $0,96 \pm 0,03$ г

соответственно ($p < 0,05$). В опытной серии (с трансплантацией неонатальной тестикулярной ткани) через 1 и 3 месяца после низведения яичек во всех опытах выявили приживший трансплантат, размеры которого возрастали с увеличением сроков наблюдения (рис. 1).

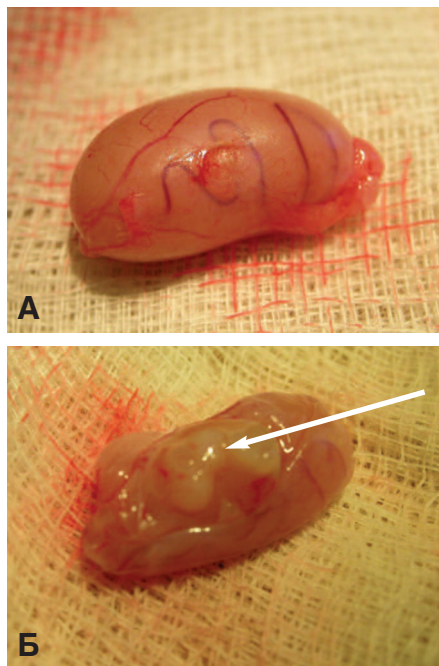


Рис. 1. Внешний вид яичка крысы через 1 месяц (А) и через 3 месяца (Б) после трансплантации ткани неонатального тестикула под белочную оболочку. Стрелкой указан приживший трансплантат

При этом масса органа в опытной серии возрастала в большей степени, чем в контрольных опытах, приближаясь к нормальным значениям – до $1,26 \pm 0,02$ и $1,59 \pm 0,03$ г через 1 и 3 месяца, соответственно. Различия между контрольной и опытной группами оказались статистически значимыми с достоверностью $p < 0,001$ (рис. 2).

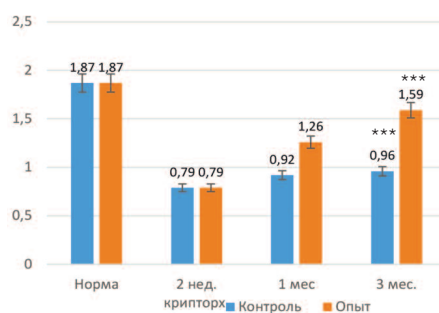


Рис. 2. Влияние трансплантации неонатальной тестикулярной ткани на восстановление массы крипторхированного яичка крысы (в граммах). *** достоверность различий между группами $p < 0,001$

Гистологическое исследование крипторхированных яичек выявило значительное нарушение сперматогенеза с появлением множества полностью запустевших или склерозированных канальцев, а также канальцев с резко дистрофированным эпителием. После низведения яичек в мошонку в контрольной серии картина менялась незначительно. Даже через 3 месяца по-прежнему сохранялось большое количество канальцев, склерозированных или полностью лишенных сперматогенного эпителия, а в канальцах с сохраненным эпителием выявляли только незрелые формы клеток (рис. 3).

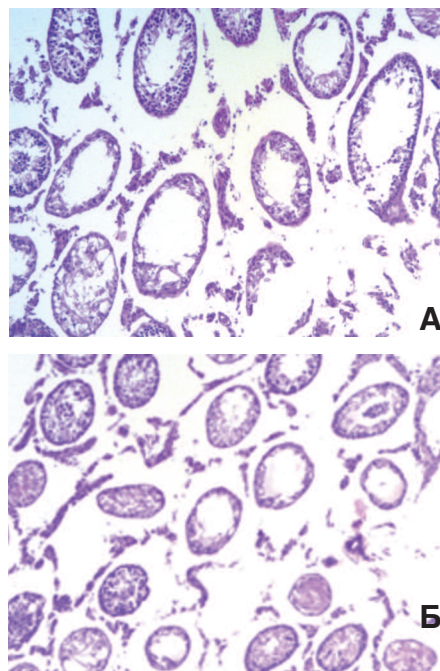


Рис. 3. Гистологическая картина крипторхированных яичек перед низведением в мошонку (А) и через 3 месяца после низведения (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100х

При исследовании яичек опытной серии выявили, что в прижившем трансплантате уже через один месяц сформировались зрелые семенные канальцы, выстланные сперматогенным эпителием разной степени зрелости. Дифференцировка клеток в канальцах доходила до стадии сперматоцитов 1-го порядка. В интерстициальной ткани трансплантата обнаружены кровеносные сосуды и скопления клеток Лейдига. Трансплантат окружен соединительнотканной капсулой, отграничивающий его от ткани яичка

реципиента (рис. 4). Через 3 месяца сохранялась такая же картина. Таким образом, пересаженная незрелая тестикулярная ткань подвергалась нормальному развитию с формированием типичных структур зрелого органа, но с незавершенным сперматогенезом.

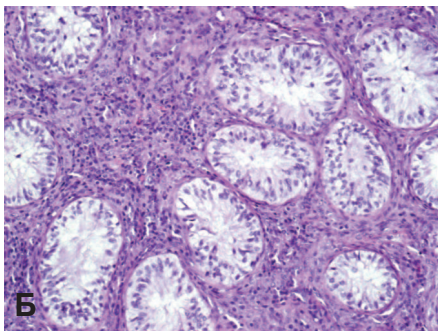
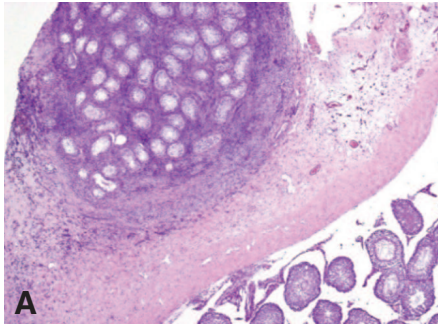


Рис. 4. Трансплантат неонатальной тестикулярной ткани через 1 месяц после пересадки под белочную оболочку крипторхированного яичка. А – общий вид трансплантата. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 50х
Б – семенные канальцы трансплантата, выстланные сперматогенным эпителием разной степени зрелости. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.200х

При этом обнаружили значительное улучшение состояния спер-

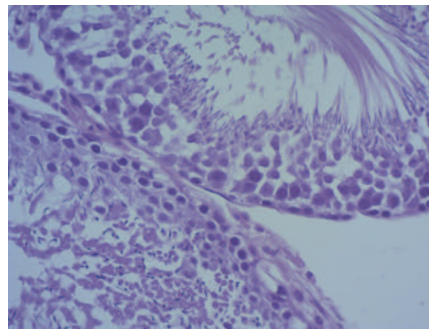


Рис. 5. Гистологическая картина крипторхированного яичка через 3 месяца после низведения в мошонку с одновременной трансплантацией неонатальной тестикулярной ткани. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400х

матогенного эпителия в семенных канальцах собственного яичка реципиента. Значительно уменьшалось число запустевших канальцев по сравнению с контрольной серией. Большинство канальцев были выстланы сперматогенным эпителием, причем во многих канальцах выявлялся полностью завершённый сперматогенез (выявляли сперматозоиды в просвете канальцев) (рис. 5).

С целью большей объективизации изменений, вызванных трансплантацией неонатальной тестикулярной ткани, провели количественный анализ ряда существенных показателей, характеризующих состояние крипторхированных яичек

в опытной и контрольной сериях, а именно, количество запустевших канальцев на единицу площади препарата, число клеток Сертоли на 1 каналец, число клеток Лейдига на единицу площади препарата, а также наличие клеток сперматогенеза разной степени дифференцировки (табл. 1).

В контрольной серии доля полностью запустевших канальцев составила через 1 месяц после низведения 75,1±6,3%, а через 3 месяца - 69,8±5,1%, тогда как в опытной серии (с трансплантацией неонатальной тестикулярной ткани) их доля значительно уменьшилась, составив всего 6,2±0,3% и 3,2±0,2% соответственно ($p<0,001$ по сравнению с контрольной серией).

Число клеток Сертоли на 1 каналец в контрольной серии составило в среднем 3,3±0,7 клеток через 1 месяц и 10,2±0,9 клеток через 3 месяца после низведения яичек, а в опытной серии этот показатель возрос до 34,6±2,2 и 41,3±1,8 клеток соответственно ($p<0,001$ по сравнению с контрольной серией).

Число интерстициальных клеток Лейдига на единицу условной площади в контрольной серии составило 1,6±0,6 и 3,2±0,6 через 1 и 3 месяца после низведения яичек, тогда как в опытной серии этот показатель составил 41,1±3,6 и 44,8±3,9 клеток через 1 и 3 месяца соответственно ($p<0,001$ по сравнению с контрольной серией).

Важным показателем состояния сперматогенеза является его завершенность, определяемая гистологически по выявлению клеток

Таблица 1. Морфометрические показатели крипторхированных яичек через 1 и 3 месяца после их низведения

Показатели	1 месяц		3 месяца	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Доля запустевших канальцев (%)	75,1±6,3	6,2±0,3***	69,8±5,1	3,2±0,2***
Кол-во клеток Сертоли на 1 каналец	3,3±0,7	34,6±2,2***	10,2±0,9	41,3±1,8
Кол-во клеток Лейдига на ед. площади препарата	1,6±0,6	41,1±3,6***	3,2±0,6	44,8±3,9***

Примечание: *** - различие по сравнению с контролем достоверно при $p<0,001$

Таблица 2. Влияние трансплантации неонатальной тестикулярной ткани на восстановление нарушенного сперматогенеза в крипторхированных яичках

Серии	Сперматогонии А светлые	Сперматогонии А темные	Сперматогонии Б	Сперматocyты 1 порядка	Сперматocyты 2 порядка	Сперматозоиды
Через 1 месяц						
Контроль (1-я серия)	100%	60%	12,5%	12,5%	0	0
Опыт (2-я серия)	100%	100%	100%***	100%***	88%***	38%***
Через 3 месяца						
Контроль (1-я серия)	100%	100%	63%	38%	13%	0
Опыт (2-я серия)	100%	100%	100%	100%***	100%***	75%***

Примечание: *** - различие по сравнению с контролем достоверно при $p<0,001$

сперматогенного эпителия разной степени зрелости вплоть до сперматозоидов. Проведенный анализ показал, что в контрольной серии в подавляющем большинстве опытов в канальцах с сохраненным сперматогенным эпителием выявляли блок сперматогенеза на уровне сперматогоний или сперматоцитов 1-го порядка (табл. 2). Через 1 месяц после низведения яичек лишь в 60% опытов в семенных канальцах выявляли темные сперматогонии А, а более зрелые формы (сперматогонии Б и сперматоциты 1-го порядка) были обнаружены в канальцах лишь в 1 из 8 опытов. Более зрелые формы не выявлялись ни в одном из опытов этой серии. Через 3 месяца картина несколько улучшилась (сперматогонии А темные выявлены в канальцах в 100% случаев, сперматогонии Б – в 63% (5 из 8 опытов), сперматоциты 1-го порядка – в 38% (3 из 8 опытов), а сперматоциты 2-го порядка – в 13% (1 из 8 опытов). Сперматозоиды в просвете канальцев не выявлены ни в одном из экспериментов.

В то же время в опытной серии через 1 месяц после низведения яичек во всех опытах сперматогенез доходил до стадии сперматоцитов 1-го порядка, а в 38% (3 из 8 опытов) в просвете канальцев выявляли зрелые сперматозоиды. Через 3 месяца во всех опытах сперматогенез доходил до стадии сперматоцитов 2-го порядка, а в 75% (6 из 8 опытов) был полностью завершены (в просвете канальцев выявляли сперматозоиды).

Поскольку мы выявили значительное восстановление популяции клеток Лейдига в крипторхированном яичке после трансплантации неонатальной тестикулярной ткани, было важно определить их функциональную активность, а именно способность к синтезу тестостерона. Определение его концентрации в крови показало, что после 2 недель пребывания яичек в брюшной полости уровень тестостерона снижается почти в 2 раза (с $2,51 \pm 0,3$

нг/мл до $1,32 \pm 0,3$ нг/мл). В контрольной серии опытов через 1 и 3 месяца после низведения яичек в мошонку он достоверно не менялся, составив $1,44 \pm 0,4$ и $1,48 \pm 0,3$ нг/мл соответственно. В то же время в опытной серии уже через 1 месяц уровень тестостерона возрастал до $2,13 \pm 0,4$ нг/мл, а через 3 месяца достигал нормальных значений ($2,87 \pm 0,5$ нг/мл).

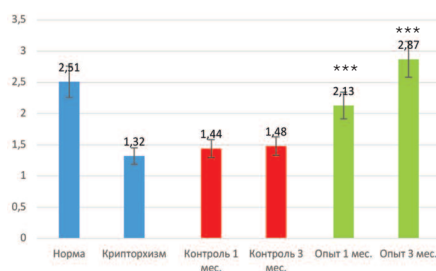


Рис. 6. Влияние трансплантации неонатальной тестикулярной ткани на уровень тестостерона плазмы крови крыс с 2-недельным экспериментально вызванным крипторхизмом. *** различия достоверны при $p < 0,001$ по сравнению с контрольной серией

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют, что трансплантация неонатальной тестикулярной ткани, полученной от новорожденных крысят (1-2 суток после рождения), взрослым крысам с нарушением сперматогенеза путем моделирования абдоминальной формы крипторхизма приводит к стимуляции регенерации поврежденных структур органа, включая клетки Сертоли, клетки Лейдига и сперматогенный эпителий. При этом происходит полное восстановление сперматогенеза до стадии сперматозоидов, чего не происходит в контрольных опытах, где трансплантация ткани не выполнялась.

В публикациях последних лет имеется много доказательств, что пересадка низкодифференцированных стволовых клеток втестискулярного происхождения, обладающих высокой пластичностью, в частности мезенхимных стволовых клеток костного мозга, жировой ткани или пупочного канатика, приводит к восстановлению сперматогенеза, нарушенного различными методами [4,13-16]. При этом име-

ются данные, что эти клетки способны трансформироваться в клетки Лейдига, продуцирующие тестостерон, с чем и связан их лечебный эффект [4,14]. Также описано положительное влияние трансплантации культивированных предшественников клеток Лейдига или стволовых клеток сперматогенного эпителия [2,3,5,17,18]. При этом также выявлено, что пересаженные в яичко сперматогонии могут трансформироваться в клетки Лейдига, секретирующие тестостерон [8], однако для этого необходима кооперация этих клеток с другими клетками их микроокружения. Если при трансплантации суспензии интерстициальной ткани, заключенной в альгинатные капсулы, в подкожную клетчатку кастрированных самцов крыс не выявляли достоверного возрастания уровня тестостерона в крови животных, то при совместной трансплантации интерстициальных клеток и семенных канальцев обнаружили формирование гормонально активных клеток Лейдига с нормализацией уровня тестостерона в крови. Авторы заключают, что интерстициальные клетки-предшественники нуждаются для дифференцировки в гормонально активные клетки в паракринных факторах, которые могут продуцироваться клетками семенных канальцев.

Именно такая ситуация имеет место в незрелых яичках плодов и новорожденных, где имеется полный набор клеток-предшественников всех структур развивающегося органа, что обеспечивает их кооперацию в условиях оптимального микроокружения («ниши»). Это предполагает, что трансплантация ткани плодных или неонатальных яичек может оказать не менее выраженный, а возможно, и более выраженный терапевтический эффект, чем при пересадке культивированных стволовых клеток какого-либо вида.

Наши эксперименты подтверждают это предположение. Транс-

плантация ткани неонатального яичка под белочную оболочку поврежденного тестикула (2 недели абдоминального крипторхизма) практически полностью восстанавливала способность к секреции тестостерона и нормализовала сперматогенез вплоть до стадии сперматозоидов. Такой выраженный эффект обеспечивался также длительным сохранением жизнеспособности пересаженной ткани, несмотря на анти-

генные различия трансплантата и реципиента (использовали аллогенный вариант трансплантации), что обеспечивалось, с одной стороны, наличием гематотестикулярного барьера, уменьшающего вероятность иммунного отторжения, а с другой стороны более низкой иммуногенностью незрелой тестикулярной ткани за счет низкой экспрессии антигенов гистосовместимости локуса МНС-1 и отсутствии антигенов локуса МНС-2 [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Трансплантация неонатальной тестикулярной ткани под белочную оболочку яичка с нарушенным сперматогенезом стимулирует регенерацию всех клеточных структур, включая клетки сперматогенного эпителия, клетки Сертоли и клетки Лейдига с восстановлением гормональной активности яичка и нормализацией сперматогенеза. ■

Ключевые слова: сперматогенез, трансплантация, гематотестикулярный барьер, тестикулярная ткань.

Key words: spermatogenesis, transplantation, hematotesticular barrier, testicular tissue.

Резюме:

В экспериментах на 20 белых беспородных крысах-самцах моделировали нарушение сперматогенеза путем перемещения обоих яичек в брюшную полость на 2 недели. После этого яички низводили в мошонку, причем в опытной серии при этом производили трансплантацию ткани яичка, полученной от новорожденных крысят (1-2 дня после рождения), под белочную оболочку. В контрольных опытах трансплантации не проводили.

При обследовании животных через 1 и 3 месяца в контрольных опытах выявили выраженную гипотрофию яичек (до 51% от нормы), резкое нарушение сперматогенеза, проявляющееся в блоке созревания клеток сперматогенного эпителия на уровне сперматогоний или сперматоцитов 1-го порядка, 3-4 кратное уменьшение количества клеток Сертоли и более чем 10-кратное уменьшение клеток Лейдига, а также почти двукратное снижение концентрации тестостерона в крови. В опытах с трансплантацией неонатальной тестикулярной ткани во всех экспериментах обнаружены прижившие трансплантаты, увеличивающие в размерах к 3 месяцам. При этом отмечали постепенное увеличение массы крипторхизированных яичек до 84% от нормы, полное восстановление сперматогенеза в большинстве канальцев (наличие сперматозоидов в просвете канальцев) и нормализацию уровня тестостерона в крови.

Считают, что выраженный терапевтический эффект трансплантации фрагментов неонатальной тестикулярной ткани связан с сохранением кооперации стволовых клеток, относящихся к различным органам структурам, в условиях оптимального микроокружения (ниши). Важным условием является длительное сохранение жизнеспособности и пролиферативной активности клеток пересаженной ткани, обусловленное иммунопривилегированностью области пересадки (наличие гематотестикулярного барьера) и низкой иммуногенностью стволовых клеток.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Summary:

Restoration of disturbed spermatogenesis after intratesticular transplantation of the neonatal testicular tissue

V.I. Kirpatovskiy, G.Yu. Kudryavtsev, L.V. Kudryavtseva, E.V. Frolova

The prospective study comprised 20 white outbred male rats with disturbed spermatogenesis, which was modeled by moving both testicles into the abdominal cavity for 2 weeks and then were returned into the scrotum. What is more testicular tissue from newborn rats (1-2 days after birth) was transplanted under the tunica albuginea in the trial series. In the control experiments, transplantations were not performed. Animal examination after 1 and 3 month revealed frank testicular hypotrophy (up to 51% of the norm); sharp spermatogenesis violation manifested in maturation block of spermatogenic epithelium at the level of spermatogonia or spermatocytes of the 1st order; 3-4 fold decrease in Sertoli cells and more than 10-fold decrease in Leydig cells, as well as an almost twofold decrease in the concentration of testosterone in the blood. In experiments with transplantation of neonatal testicular tissue established transplants, which size increased by 3 months, were found. Wherein a gradual increase in the mass of cryptorchid testicles up to 84% of the norm, complete recovery of spermatogenesis in most of the tubules (presence of spermatozoa in the lumen of the tubules) and normalization of the testosterone level in the blood were registered. A pronounced therapeutic effect of the neonatal testicular tissue fragments transplantation is believed to be associated with the preservation of the different organ structures' stem cells cooperation in an optimal microenvironment (niche). Also the long-term preservation of the viability and proliferative activity of the transplanted tissue cells, which is determined by the immunopriety of the transplantation area (the presence of the hemato-testicular barrier) and the low immunogenicity of stem cells, is very important.

Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дендеберов Е.С., Кирпатовский И.Д., Михалева Л.М. Новые подходы к лечению крипторхизма, сочетающегося с вторичным гипогонадизмом. *Проблемы репродукции* 2001;(2):68.
2. Deng B, Bondarenko T, Pakhomov O. Changes in sexual behavior of orchidectomized rats under influence of allotransplantation of testicular interstitial cell suspension. *Cell Transplant* 2017;26(5):795-803. doi: 10.3727/096368916X693301.
3. Goodyear S, Brinster R. Spermatogonial stem cell transplantation to the testis. *Cold Spring Harb Protoc.* 2017;2017(4):pdb.prot094235. doi:10.1101/pdb.prot094235.
4. Ghasemzadeh-Hasankolaei M, Eslaminejad MB, Ghasemzadeh-Hasankolaei M. Functional germ cells from non-testicular adult stem cells: a dream or reality? *Curr Stem Cell Res Ther* 2018;13(1):60-79. doi:10.2174/1574888X12666171107105136.
5. Zang ZJ, Wang J, Chen Z, Zhang Y, Gao Y, Su Z, et al. Transplantation of CD51+ Stem Leydig cells: a new strategy for the treatment of testosterone deficiency. *Stem Cells* 2017;35(5):1222-1232. doi: 10.1002/stem.2569.
6. Камалов А.А., Кирпатовский В.И., Охоботов Д.А., Ефименко А.Ю. и др. Использование нового биоматериала на основе продуктов секреции мезенхимных стволовых клеток человека и коллагена для восстановления сперматогенеза на модели экспериментального крипторхизма. *Технологии живых систем* 2017;14(1):4-17.
7. Alves-Lopes JP, Stukenborg JB. Testicular organoids: a new model to study the testicular microenvironment in vitro? *Hum Reprod Update* 2017;24(2): 176-191. doi: 10.1093/humupd/dmx036.
8. Chen H, Jin S, Huang S, Folmer J, Liu J, Ge R, Zirkin BR. Transplantation of alginate-encapsulated seminiferous tubules and interstitial tissue into adult rats: Leydig stem cell differentiation in vivo? *Mol Cell Endocrinol* 2016;436:250-8. doi: 10.1016/j.mce.2016.08.046.
9. Del Vento F, Vermeulen M, de Michele F, Giudice MG, Poels J, des Rieux A, et al. Tissue engineering to improve immature testicular tissue and cell transplantation outcomes: one step closer to fertility restoration for prepubertal boys exposed to gonadotoxic treatments. *Int J Mol Sci* 2018;19(1). pii: E286. doi: 10.3390/ijms19010286.
10. Hotary K, Edward A, Punturieri A, Yana I, Weiss S J. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol* 2000;149(6):1309-1323. doi: 10.1083/jcb.149.6.1309.
11. Akhmanova M, Osidak E, Domogatsky S, Rodin S, Domogatskaya A. Physical, spatial, and molecular aspects of extracellular matrix of in vivo niches and artificial scaffolds relevant to stem cells research. *Stem Cells Int* 2015;2015:167025 doi:10.1155/2015/167025.
12. Кирпатовский В.И., Ефремов Г.Д., Фролова Е.В. Эктопический органогенез при аллотрансплантации ткани свежееудаленного или криоконсервированного неонатального яичка под капсулу почки крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2018;166(8):230-236.
13. Abd Allah SH, Pasha HF, Abdelrahman AA, Mazen NF. Molecular effect of human umbilical cord blood CD34-positive and CD34-negative stem cells and their conjugate in azoospermic mice. *Mol Cell Biochem.* 2017;428(1-2):179-191. doi: 10.1007/s11010-016-2928-2.
14. Peak TC, Haney NM, Wang W, DeLay KJ, Hellstrom WJ. Stem cell therapy for the treatment of Leydig cell dysfunction in primary hypogonadism. *World J Stem Cells* 2016 Oct 26;8(10):306-315.
15. Wang YJ, Yan J, Zou XL, Zhao Y, Meng CY, Yin F, Guo L. Bone marrow mesenchymal stem cells repair cadmium-induced rat testis injury by inhibiting mitochondrial apoptosis. *Chem Biol Interact* 2017;271:39-47. doi: 10.1016/j.cbi.2017.04.024.
16. Jia F, Yudong W, Xin T, Shanling Z, Jinlian H. Immortalization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells and their seminiferous tubules transplantation. *J Cell Biochem* 2018;119(4):3663-3670.
17. Ganguli N, Wadhwa N, Usmani A, Kunj N, Ganguli N, Sarkar RK, et al. An efficient method for generating a germ cell depleted animal model for studies related to spermatogonial stem cell transplantation. *Stem Cell Res Ther* 2016;7(1):142.
18. Mulder CL, Catsburg LAE, Zheng Y, de Winter-Korver CM, van Daalen SKM, van Wely M, et al. Long-term health in recipients of transplanted in vitro propagated spermatogonial stem cells. *Hum Reprod* 2018;33(1):81-90. doi: 10.1093/humrep/dex348.
19. Majumdar A, Ferber I, Lebkowsky J, Chadwick K, Rouleau A, Gallacher L, et al. Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties. *Stem Cells* 2004;22(4):448-456.

REFERENCES (1, 6, 12)

1. Dendeberov E.S., Kirpatovskij I.D., Mihaleva L.M. Novie podhodi k lecheniju kriptorhizma, sochetajushegosja s vtorichnim gipogonadizmom. [New approaches to the treatment of cryptorchidism, combined with secondary hypogonadism.]. *Problemi reprodukcii* 2001;(2):68. (In Russian)
6. Kamalov A.A., Kirpatovskij V.I., Ohobotov D.A., Efimenko A.Ju. et al. Ispolzovanie novogo biomateriala na osnove produktov sekretsii mezenhimnih stvolovih kletok cheloveka i kollagena dlja vosstanovlenija spermatogeneza na modeli eksperimentalnogo kriptohizma. [The application of a novel biomaterial based on the secreted products of human mesenchymal stem cells and collagen for spermatogenesis restoration in the model of experimental cryptorchidism]. *Tehnologii zhivih system* 2017;14(1):4-17. (In Russian)
12. Kirpatovskij V.I., Efremov G.D., Frolova E.V. Ektopicheskiy organogenez pri allotransplantatsii tkani svezheudalennogo ili kriokonservirovannogo jaichka pod kapsulu pochki kris. [Ectopic organogenesis in the allotransplantation of the tissue of a freshly removed or cryopreserved neonatal testicle under the capsule of a kidney of rats]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2018;166(8):230-236.