

КЛЕТКИ ЛЕЙДИГА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА ДОКСОРУБИЦИНОМ

**Мнацаканян А.О.¹,
Басалова Н.А.¹,
Сагарадзе Г.Д.¹,
Liang Yingying^{1,2},
Нагибин Н.В.¹,
Попов В.С.¹,
Ефименко А.Ю.¹**

¹ Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (119234, г. Москва, Ломоносовский проспект, 27, к.10, Россия)

² MSU-BIT University (Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне) (518172, 1 International University Park Road, Shenzhen, Guangdong Province, China)

Автор, ответственный за переписку:
Мнацаканян Анна Олеговна
e-mail: monakova-anya@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Ранее на животных моделях было показано, что секретом мезенхимных стромальных клеток (МСК) может восстанавливаться ниша сперматогонияльной стволовой клетки. На модели токсического повреждения сперматогенеза доксорубицином у мышей показано, что биораспределение секрета МСК при введении под белочную оболочку яичка происходит преимущественно в интерстиции, большую часть которого составляют клетки Лейдига. Однако влияние секрета МСК на клетки Лейдига при повреждении доксорубицином остаётся неизученным.

Цель исследования. Изучить влияние секрета МСК на клетки Лейдига при повреждении доксорубицином *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы. Повреждение сперматогенеза моделировали на мышах C57Bl/6, которым внутривбрюшинно вводили доксорубицин (суммарно 10 мг/кг). Исследовали 3 группы животных: интактные, с повреждением, с введением секрета МСК. Для исследований *in vitro* к культуре клеток Лейдига добавляли доксорубицин в диапазоне концентраций 0,15–1,5 мкМ и секретом МСК.

Результаты. В результате повреждения доксорубицином *in vivo* масса семенников мышей уменьшается и не восстанавливается после инъекции секрета МСК. Площадь интерстиция при повреждении возрастает, введение секрета МСК приводит к тенденции снижения площади (нормализации) интерстиция. При этом количество клеток Лейдига значимо не изменяется. В исследованиях *in vitro* воздействие на клетки Лейдига доксорубицином вызывает дозозависимую гибель клеток. Добавление секрета МСК к клеткам Лейдига при повреждении способствует увеличению выживаемости клеток и секреции тестостерона, в результате чего общее содержание тестостерона в среде клеток Лейдига возрастает.

Заключение. Секретом МСК может воздействовать на клетки Лейдига при повреждении доксорубицином, увеличивая их количество и секреторную активность, что может способствовать восстановлению интерстиция. Представленные данные обосновывают дальнейшее изучение секрета МСК в качестве перспективного терапевтического средства для восстановления функции семенников.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, секретом, клетки Лейдига, доксорубицин, ниша, сперматогенез

Статья поступила: 31.03.2026
Статья принята: 20.08.2026
Статья опубликована: 09.10.2026

Для цитирования: Мнацаканян А.О., Басалова Н.А., Сагарадзе Г.Д., Liang Yingying, Нагибин Н.В., Попов В.С., Ефименко А.Ю. Клетки Лейдига как потенциальная мишень препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток при токсическом повреждении сперматогенеза доксорубицином. *Acta biomedica scientifica*. 2026; 11(4): 29-37. doi: 10.29413/ABS.2026-11.4.4

LEYDIG CELLS AS A POTENTIAL TARGET OF A DRUG BASED ON MESENCHYMAL STROMAL CELL SECRETOME IN DOXORUBICIN INDUCED TOXIC DAMAGE OF SPERMATOGENESIS

Mnatsakanyan A.O.¹,
Basalova N.A.¹,
Sagaradze G.D.¹,
Liang Yingying^{1, 2},
Nagibin N.V.¹,
Popov V.S.¹,
Efimenko A.Yu.¹

¹ Medical Research and Educational
Institute, Lomonosov Moscow State
University (Lomonosovskiy av. 27/10,
Moscow 119234, Russian Federation)

² MSU-BIT University (1 International
University Park Road, Guangdong
Province, Shenzhen 518172, China)

Corresponding author:

Anna O. Mnatsakanyan

e-mail: monakova-anyan@mail.ru

ABSTRACT

Background. Previously, it has been shown in animal models that the secretome of mesenchymal stromal cells (MSCs) can restore the spermatogonial stem cell niche. In a mouse model of doxorubicin-induced toxic damage to spermatogenesis, it was shown that the biodistribution of MSC secretome following administration under the tunica albuginea of the testis occurs mainly in the interstitium, which consists predominantly of Leydig cells. However, the effect of MSC secretome on Leydig cells under doxorubicin-induced damage remains unexplored.

Aim. To study the effect of MSC secretome on Leydig cells under doxorubicin-induced damage in vitro and in vivo.

Materials and Methods. Spermatogenesis damage was modeled in C57Bl/6 mice, which received intraperitoneal injections of doxorubicin at a total dose of 10 mg/kg. Three groups of animals were studied: intact, damaged, and MSC secretome-treated. For in vitro studies, doxorubicin (at concentrations ranging from 0.15 to 1.5 μ M) and MSC secretome were added to Leydig cell cultures.

Results. Following doxorubicin-induced damage in vivo, mouse testis weight decreased and did not recover after MSC secretome injection. The interstitial area increased upon damage, while administration of MSC secretome tended to reduce (normalize) the interstitial area. At the same time, the number of Leydig cells did not change significantly. In in vitro studies, exposure of Leydig cells to doxorubicin induced dose-dependent cell death. Addition of MSC secretome to Leydig cells under damage conditions enhanced cell survival and testosterone secretion, resulting in an increase in total testosterone content in the Leydig cell culture medium.

Conclusion. MSC secretome can act on Leydig cells under doxorubicin-induced damage by increasing their number and secretory activity, which may contribute to interstitial recovery. These findings provide a rationale for further investigation of MSC secretome as a promising therapeutic agent for restoring testicular function.

Keywords: mesenchymal stromal cells, secretome, Leydig cells, doxorubicin, niche, spermatogenesis

Received: 31.03.2026

Accepted: 20.08.2026

Published: 09.10.2026

For citation: Mnatsakanyan A.O., Basalova N.A., Sagaradze G.D., Liang Yingying, Nagibin N.V., Popov V.S., Efimenko A.Yu. Leydig cells as a potential target of a drug based on mesenchymal stromal cell secretome in doxorubicin induced toxic damage of spermatogenesis. *Acta biomedica scientifica*. 2026; 11(4): 29-37. doi: 10.29413/ABS.2026-11.4.4

ВВЕДЕНИЕ

Развитие многих тяжёлых заболеваний может быть связано с нарушением ниши стволовой клетки, которая представляет собой комплекс поддерживающих клеток, внеклеточного матрикса, паракринных факторов, физико-химических параметров [1, 2]. В частности, одной из причин мужского бесплодия может быть повреждение ниши сперматогониальной стволовой клетки (ССК) [3, 4]. В нише ССК можно выделить две основные структурные единицы: семенные канальцы и интерстициальное пространство между канальцами. Основными клеточными компонентами семенных канальцев, входящими в состав поддерживающих сперматогенез клеток ниши ССК, являются перитубулярные миоидные клетки и клетки Сертоли. Окружающее семенные канальцы интерстициальное пространство включает, главным образом, клетки Лейдига (около 80 %), а также мезенхимные и иммунные клетки [5]. Терапевтический агент, направленный на восстановление ниши стволовой клетки, должен действовать на разные компоненты ниши, тем самым восстанавливая её целиком. Таким действием, согласно ранее опубликованным данным, могут обладать мезенхимные стромальные клетки (МСК) за счёт секреции комплекса паракринных биологически активных факторов – секретомы [6, 7]. В составе секретомы МСК можно выделить сотни регуляторных молекул, включая цитокины (IL-6, IL-8 и т.д.), хемокины (CCL2; CXCL-3, CXCL-5, CXCL-10 и др.), факторы роста (VEGF, BDNF, GDNF, FGF, PEGF и др.), белки внеклеточного матрикса (фибронектин, коллагены, ламинины, фибулины, аргин, бигликан и др.), другие регуляторные белки (ингибин А, тромбоспондин-1, MMP-2, MMP-9, програнулин, UPAR, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6, IGFBP-7, Т-кадгерин, PAI-1, PAI-2 и др.) [8]. Важным компонентом секретомы МСК являются регуляторные РНК (микроРНК-21, микроРНК-29с и др.), которые переносятся преимущественно в составе внеклеточных везикул [9, 10].

Ранее было показано, что введение секретомы МСК человека под белочную оболочку яичка на модели токсического повреждения сперматогенеза у мышей доксорубицином способствует восстановлению ниши ССК и, как следствие, сперматогенеза. В результате изучения биораспределения показано, что аналог белковой фракции секретомы МСК рекомбинантный зелёный флуоресцирующий белок (rGFP) при введении под белочную оболочку яичка распределяется преимущественно в интерстиции, большую часть которого составляют клетки Лейдига. Был сделан вывод о том, что клетки Лейдига могут быть первичной мишенью препарата на основе секретомы МСК [11]. Однако, как влияет секретомы МСК на клетки Лейдига при повреждении доксорубицином *in vivo* и *in vitro* до сих пор остаётся неизвестным.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить влияние секретомы МСК на клетки Лейдига при повреждении доксорубицином *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение секретомы мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека

МСК от различных доноров были получены из биобанка Центра регенеративной медицины МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова. Для получения секретомы МСК жировой ткани человека клетки пятого пассажа, достигшие примерно 80 % конфлюэнтности, трижды промывали раствором Хэнкса. Затем раствор заменяли на среду ДМЕМ с низким содержанием глюкозы и инкубировали в течение 7 суток. После этого кондиционированную среду, включающую компоненты секретомы МСК, собирали и очищали от клеточных примесей посредством поэтапного центрифугирования: сначала при 300 g в течение 10 мин при +4°C, затем при 2000 g в течение 30 мин. Для концентрирования секретомы МСК использовали фильтры-концентраторы «JetSpin» (размер пор 10 кДа, Jet Bio-Filtration). Полученный концентрированный раствор дозировали во флаконы по 0,5 мл с последующей лиофилизацией и хранением при температуре +2...+8 °C.

Животные

Исследование проводили на зрелых самцах мышей линии C57Bl/6 в возрасте 3,5–4,0 месяцев с массой тела 15–23 г. Животные были получены из питомника ФИБХ РАН (г. Пущино). Эксперименты выполняли в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/EU и были одобрены биоэтическим комитетом МГУ имени М.В. Ломоносова (протокол № 90-ж от 17 мая 2019 года). Доксорубицин вводили внутривентрально в дозе 1 мг/кг с периодичностью раз в два дня. Суммарная доза введённого доксорубицина составила 10 мг/кг.

Готовую лекарственную форму секретомы МСК для введения животным получали путём смешивания 1 части по объёму восстановленного из лиофилизата раствора секретомы МСК и 4 частей по объёму свиного коллагена Аппликолл (ООО «МакМеди») для получения необходимой дозы для введения. Готовую лекарственную форму вводили однократно под белочную оболочку яичка сразу после токсического повреждения (на 21 день после начала манипуляций с животными). Таким образом, было сформировано 3 группы: «интактные», «повреждение», «секретомы МСК».

Гистологический анализ семенников

Через три месяца после начала эксперимента животных подвергали эвтаназии с использованием диоксида углерода (CO₂), а на конечном этапе выполняли цервикальную дислокацию. Во время эвтаназии у самцов забирали семенники, материал фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина в течение 24 часов. После чего по стандартной методике заливали в парафин и готовили гистологические срезы толщиной 5–7 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Для иммуногистохимического анализа из парафиновых блоков семенников готовили поперечные срезы толщиной 1 мкм, депарафинизировали их в ксилоле и спиртовой батарее с постепенно убывающей концентрацией спирта до воды, после чего проводили

демаскировку антигенов на водяной бане в 0,1 М цитратном буфере в течение 20 минут при 98°C. В исследовании использовали антитела и красители: маркер ДНК — DAPI (D9542, Sigma); маркер клеток Лейдига — CYP11A1 (DF4697, Affinity); контрольные неспецифические антитела IgG (AB-105-C, R&D). Затем добавляли вторые антитела с флуоресцентной меткой Alexa 488 (A11034, Invitrogen).

Микроскопическое исследование выполняли с использованием микроскопа Leica DM600B, оснащённого камерой Leica DFC 420C (Leica Microsystems GmbH) и программным обеспечением LasX, выбирая репрезентативные поля зрения для получения микрофотографий. Обработку и количественный анализ изображений выполняли с использованием программного обеспечения LasX (Leica Microsystems GmbH) и Fiji.

Выделение фракции, обогащенной клетками Лейдига, из семенников грызунов

После эвтаназии у мыши половозрелого возраста забирали семенники и помещали в раствор Хэнкса с 5 % смесью антибиотиков (пенициллин-стрептомицин). В условиях стерильного ламинарного бокса снимали белочную оболочку и отделяли крупные сосуды. В чашке Петри промывали оставшиеся после снятия белочной оболочки семенные канальцы раствором Хэнкса с 5 % антибиотиком. Затем канальцы переносили в стерильную пробирку, добавляли среду ДМЕМ, содержащую 2,5 мг/мл трипсина и ДНКазу 10 мг/мл, и инкубировали при температуре 34–35°C в течение 4–10 мин, периодически помешивая. Добавляли среду, ингибирующую воздействие ферментов, – ДМЕМ + 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС), аккуратно перемешивали переворачиванием пробирки. После оседания канальцев жидкость над канальцами, содержащую клетки Лейдига, отбирали в новую пробирку. Повторяли пункт отмывки 5 раз. Полученную суспензию интерстициальных клеток (преимущественно клеток Лейдига) центрифугировали 300 g в течение 10 мин, сливали надосадочную жидкость и осадок пипетировали в среде ДМЕМ-Ф12 + 2%ФБС + 1x инсулин-трансферрин-селенита (ITS), фильтровали полученную суспензию через фильтр 100 мкм.

Модель для оценки специфической активности секрета МСК *in vitro* на клетках Лейдига

Базовая модель на интактных клетках Лейдига была запатентована (патент РФ «Тест-система для оценки стимуляции секреторной активности модельных клеток терапевтическими агентами, направленными на восстановление сперматогенеза» № 2825785 от 29 августа 2024 г.) Клетки Лейдига после выделения (день 0) рассаживали в лунки 48-луночного планшета в среде роста ДМЕМ-Ф12, 1x ITS и 2 % ФБС. На 2-й день после выделения (день 2) все лунки промывали 3 раза раствором Хэнкса и проводили смену среды на среду для культивирования или среду для культивирования, содержащую доксорубин в концентрациях 0,15; 0,5; 1; 1,5 мкМ. Затем на 3-й день клетки промывали 3 раза раствором Хэнкса и добавляли среду ДМЕМ с низкой концентрацией глюкозы (1 г/л) без фенолового красного

или секретом МСК. На 5-й день собирали среду с лунок каждой группы, центрифугировали с режимом 300 g в течение 10 мин для осаждения клеточного дебриса. Затем собирали супернатант и определяли в нём количество тестостерона методом иммуноферментного анализа (CAN-TE-250, DBC).

Иммуноцитохимический анализ

Клеточную культуру после удаления среды промывали раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ) и фиксировали 3,7 % раствором забуференного параформальдегида на ФСБ. Ядра окрашивали раствором DAPI (D9542, Sigma). Микроскопическое исследование проводили на микроскопе Leica DMi8, снабженного камерой Leica DFC 7000 T (Leica Microsystems GmbH), используя репрезентативные поля зрения для получения фотографий. Обработку и количественный анализ изображений выполняли с использованием программного обеспечения LasX (Leica Microsystems GmbH) и Fiji.

Статистический анализ

Для всех данных была применена описательная статистика: данные были проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро – Уилка. В случае нормального распределения были рассчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего. В случае несоответствия данных закону нормального распределения были рассчитаны медиана и квартильный размах. Для оценки данных с признаками нормального распределения использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), а для данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, – критерий Краскела – Уоллиса с последующим межгрупповым сравнением средних рангов.

Все статистические расчёты проводились с помощью программы Prism GraphPad (GraphPad Software, США), при этом различия считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При повреждении доксорубином масса семенников значительно снижается, введение секрета МСК не влияет на массу семенников (рис. 1).

При токсическом повреждении доксорубином увеличивается площадь интерстиция семенников. При введении секрета МСК под белочную оболочку яичка наблюдается тенденция к снижению (нормализации) площади интерстиция (рис. 2).

Большую часть интерстиция (около 80 %) занимают клетки Лейдига. Мы предположили, что увеличение площади интерстиция может быть связано с увеличением количества клеток Лейдига.

Абсолютное число клеток Лейдига на срез и плотность клеток Лейдига в ткани практически не изменяется при повреждении доксорубином (рис. 3).

Для исследования ответа клеток Лейдига на секрет МСК в модели повреждения доксорубином *in vitro* были выбраны следующие концентрации повреждающего агента 0,15; 0,5; 1,0; 1,5 мкМ.

Как видно из рисунка 4А, в отличие от результатов *in vivo*, при повреждении клеток Лейдига доксорубицином *in vitro* количество клеток дозозависимо снижается. При этом секретом МСК способствует увеличению числа клеток Лейдига при умеренном повреждении (до 1 мкМ доксорубицина), что согласуется с данными экспериментов *in vivo*. Кроме того, секретом МСК при сильном повреждении способствует увеличению количества тестостерона, секретируемого клетками Лейдига (рис. 4Б). Таким образом, при повреждении клеток Лейдига доксорубицином происходит дозозависимое снижение уровня тестостерона преимущественно за счёт уменьшения количества клеток. Повышение общего количества тестостерона при воздействии секрета МСК происходит, по-видимому, за счёт улучшения выживаемости клеток Лейдига и их способности секретировать тестостерон (рис. 4В).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что локальное введение секрета МСК является эффективным терапевтическим подходом для восстановления сперматогенеза, опосредованного воздействием на компоненты ниши

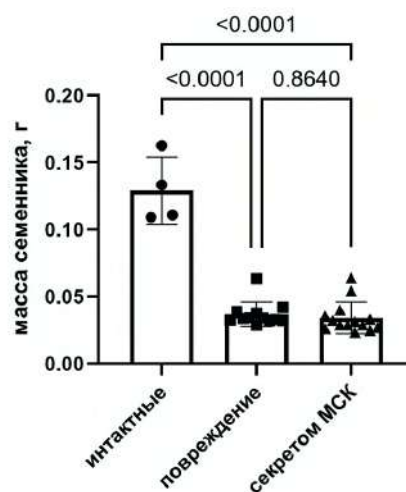


РИС. 1.

Масса семенников мышей снижается при повреждении сперматогенеза доксорубицином. Данные представлены как среднее и стандартное отклонение.

FIG. 1.

Testis weight decreased in mice after doxorubicin-induced spermatogenesis damage. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation.

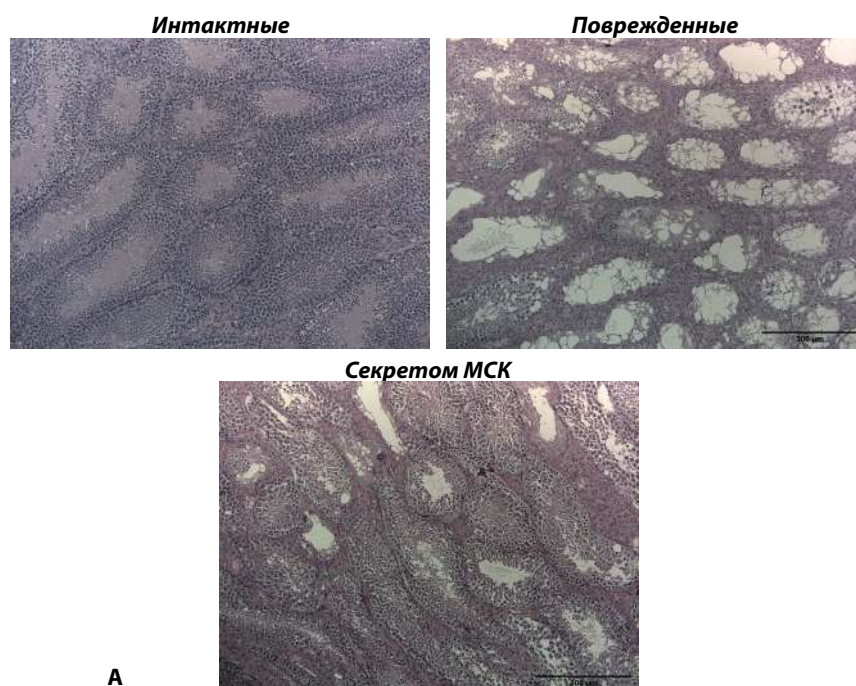


РИС. 2.

Показатели ответа интерстиция на повреждение сперматогенеза доксорубицином у мышей. **А** – гистологическая картина семенников интактных мышей, мышей из группы «повреждение» (повреждение доксорубицином) и мышей из группы «секретом МСК», окраска гематоксилином и эозином. Масштабная линейка отмечает 300 мкм. **Б** – площадь интерстиция на гистологических срезах яичек в пересчёте на одно животное после введения препарата на основе секрета МСК. Данные представлены как среднее и стандартное отклонение.

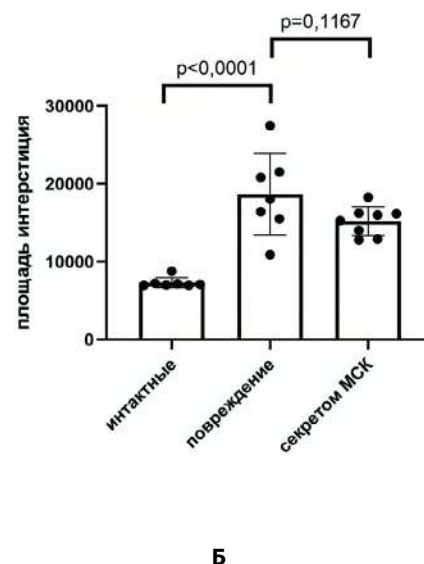


FIG. 2.

Indicators of the interstitial response to doxorubicin induced spermatogenesis damage in mice. **A** – histological analysis of intact mouse testes, testes from the “damage” group (doxorubicin induced damage), and testes from the “MSC secretome” group, stained with hematoxylin and eosin. Scale bar indicates 300 μ m. **B** – interstitial area on testicular histological sections per animal after administration of the MSC secretome based drug. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation.

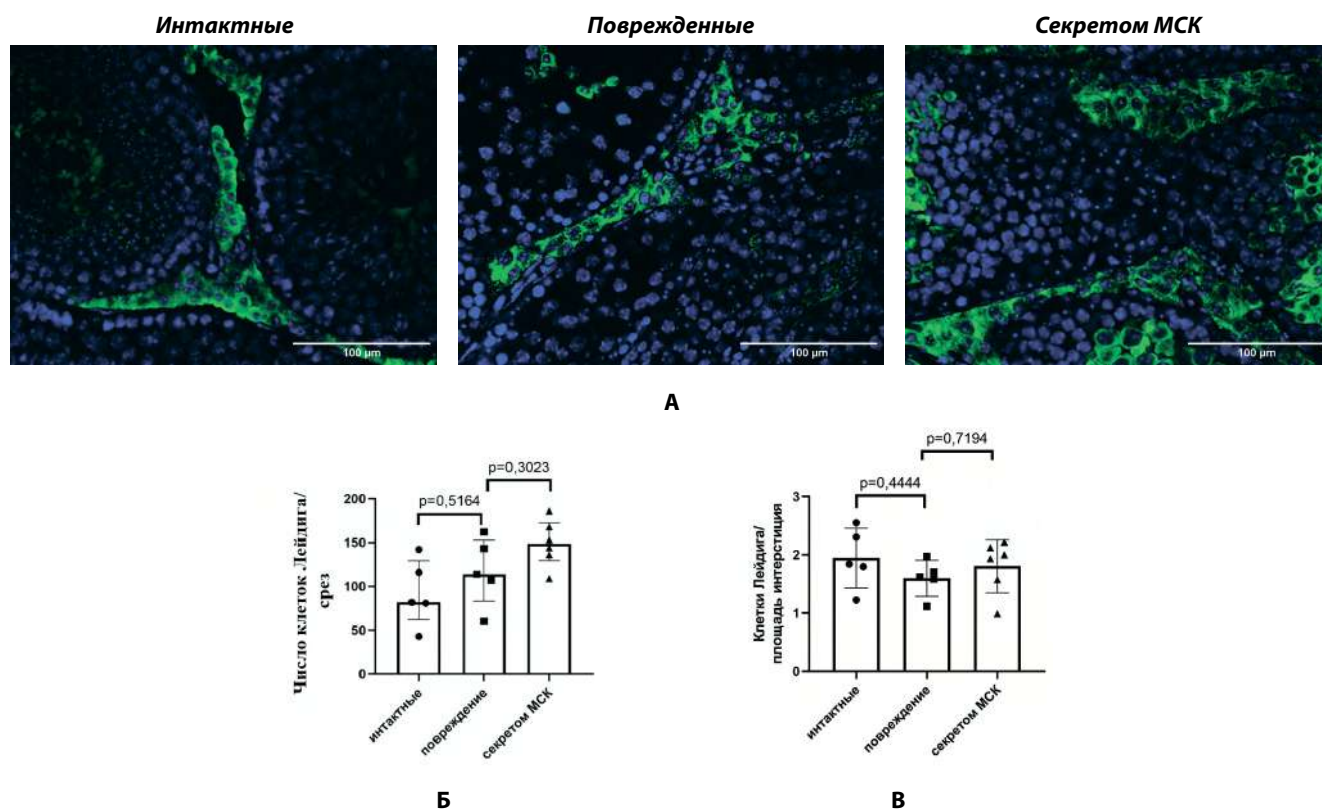


РИС. 3.

Оценка влияния препарата на основе секретома МСК на количество клеток Лейдига на модели токсического повреждения сперматогенеза у мышей. **А** – иммуногистохимический анализ экспрессии CYP11A1 в семенниках intactных мышей, мышей из группы «повреждение» (повреждение доксорубицином) и мышей из группы «секретом МСК». Зелёный псевдоцвет – окраска CYP11A1 (специфический маркер клеток Лейдига), синий псевдоцвет – окраска DAPI (маркер ядер). Масштабный отрезок отмечает 100 мкм. **Б** – количество CYP11A1+ клеток на срез. Результаты представлены как среднее и стандартное отклонение. **В** – количество CYP11A1+ клеток, нормированное на площадь интерстиция. Результаты представлены как среднее и стандартное отклонение.

FIG. 3.

Assessment of the effect of the MSC secretome based drug on Leydig cell numbers in a mouse model of toxic spermatogenesis damage. **A** – immunohistochemical analysis of CYP11A1 expression in the testes of intact mice, mice from the “damage” group (doxorubicin induced damage), and mice from the “MSC secretome” group. Green pseudocolor – CYP11A1 staining (specific marker of Leydig cells); blue pseudocolor – DAPI staining (nuclear marker). Scale bar indicates 100 μ m. **B** – number of CYP11A1+ cells per section. Results are presented as mean $\pm$ standard deviation. **B** – number of CYP11A1+ cells, normalized as mean $\pm$ standard deviation.

ССК [11, 12]. Также было обнаружено, что при введении под белочную оболочку яичка секретом МСК распределяется преимущественно в интерстиции. На основании этого был сделан вывод, что первичная мишень секретома МСК может находиться в интерстициальном пространстве [11]. В настоящем исследовании нами было показано, что при повреждении доксорубицином масса семенников снижается, при этом площадь интерстиция увеличивается, что согласуется с исследованием других авторов. Авторы показали, что разрастание интерстиция является, по-видимому, компенсаторным, поскольку происходит уменьшение площади семенных канальцев [13]. При введении секретома МСК масса семенников не изменяется, однако наблюдается тенденция к уменьшению (нормализации) площади интерстиция, что, возможно, связано с восстановлением единичных семенных канальцев. В состав интерстиция входят главным образом эндокринные клетки

(клетки Лейдига), клетки иммунной системы (макрофаги, Т-клетки, дендритные клетки и др.) и стромальные клетки (фибробласты, МСК и др.) [6, 14]. Как показано в результатах, количество клеток Лейдига в ткани при повреждении практически не меняется. Однако ранее нами было показано, что при повреждении увеличивается число CD163+ и CD206+ M2 макрофагов и CD90+ клеток резидентных МСК, которые могут вносить существенный вклад в изменение площади интерстиция [15, 16]. Введение секретома МСК практически не влияет на количество этих клеток. Интересно, что в модели физиологического повреждения сперматогенеза крипторхизма у крыс наблюдается обратный эффект – при повреждении количество клеток Лейдига существенно увеличивается, что, вероятно, является компенсаторной реакцией, а введение секретома МСК снижает (нормализует) число клеток Лейдига [17]. Две модели демонстрируют разный уровень повреждения

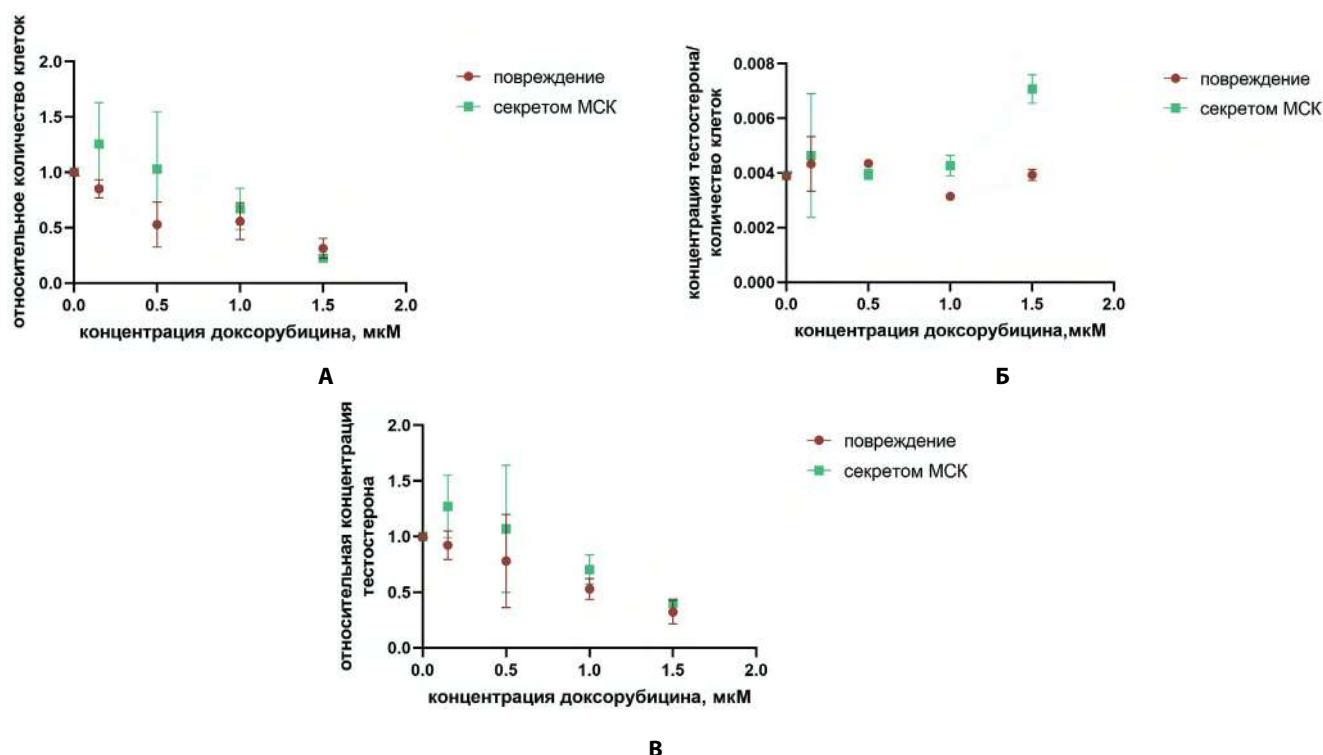


РИС. 4.

Параметры токсического повреждения доксорубицином клеток Лейдига и действия секрета МСК *in vitro*. **А** – зависимость относительного количества клеток Лейдига от степени повреждения доксорубицином и воздействия секрета МСК (значения контроля приняты за единицу). **Б** – зависимость концентрации тестостерона, нормированного на количество клеток, от степени повреждения доксорубицином и воздействия секрета МСК. **В** – зависимость относительной концентрации тестостерона в среде клеток Лейдига от степени повреждения доксорубицином и воздействия секрета МСК (значения контроля приняты за единицу). Данные представлены как медиана $\pm$ SEM, $n = 2$.

FIG. 4.

Parameters of doxorubicin induced toxic damage to Leydig cells and the effect of MSC secretome *in vitro*. **A** – dependence of the relative number of Leydig on the degree of doxorubicin induced damage and exposure to MSC secretome (control values are taken as unity). **B** – dependence of testosterone concentration normalized to cell number on the degree of doxorubicin induced damage and exposure to MSC secretome. **B** – dependence of the relative testosterone concentration in the Leydig cell culture medium on the degree of doxorubicin induced damage and exposure to MSC secretome (control values are taken as unity). Data are presented as median $\pm$ SEM, $n = 2$.

и восстановления интерстиция, что может быть связано с природой повреждения и, как следствие, разным клеточным ответом.

В экспериментах *in vitro* было показано повреждающее действие доксорубина на клетки Лейдига. При добавлении доксорубина в концентрациях 0,15; 0,5; 1,0; 1,5 мкМ наблюдали дозозависимое снижение числа клеток Лейдига. Основные механизмы цитотоксичности доксорубина хорошо изучены: препарат интеркалирует в ДНК и подавляет активность топоизомеразы II, тем самым ингибируя матричные процессы. Дополнительный вклад вносит развитие окислительного стресса, что усиливает токсическое действие доксорубина [18]. Поскольку транскрипция ДНК наиболее активна в клетках с высоким потенциалом к делению, в большей степени токсическому действию доксорубина подвергаются стволовые клетки и клетки их дифференцировки [19, 20]. В меньшей мере известно про повреждающее действие на клетки ниши стволовых клеток. Механизмы повреждающего действия доксорубина на клетки Лейдига практически не изучены. В некоторых исследованиях показана способность доксорубина

изменять профиль микроРНК в клетках Лейдига, что может привести к ферроптозу [18]. Мы показали, что секретом МСК способствует выживанию клеток Лейдига *in vitro* после токсического воздействия доксорубина. Одним из основных антиапоптотических факторов в составе секрета МСК, способствующих выживаемости клеток Лейдига, может являться IGF-1 [21]. Кроме того, секретом МСК приводит к увеличению секреторной активности клеток Лейдига при повреждении. Это сходится с данными, которые были получены нами ранее – добавление секрета МСК к интактным клеткам Лейдига стимулирует секрецию тестостерона по сравнению с отрицательным контролем, что легло в основу модели оценки специфической активности препарата на основе секрета МСК. В увеличении секреции тестостерона важную роль могут играть компоненты секрета МСК – фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и микроРНК-21 [11, 22].

Полученные результаты демонстрируют важную роль ниши для поддержания клеток. При повреждении доксорубицином *in vitro* критически дозозависимо снижается число клеток Лейдига, а при токсическом

воздействии *in vivo* количество клеток Лейдига практически не изменяется. Данный эффект может быть обусловлен влиянием клеток ниши ССК, в том числе резидентных МСК, что требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, секретом МСК может комплексно воздействовать на клетки Лейдига при повреждении, оказывая влияние на их выживаемость и секреторную активность, что может способствовать восстановлению интерстиция семенников. Представленные данные подтверждают перспективность секретома МСК как эффективного терапевтического средства для восстановления ниши ССК.

Финансирование

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-75-30005, <https://rscf.ru/project/25-75-30005/>.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hoggatt J, Kfoury Y, Scadden DT. Hematopoietic Stem Cell Niche in Health and Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2016; 11: 555–581. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044414
- Mannino G, Russo C, Maugeri G, et al. Adult stem cell niches for tissue homeostasis. *Journal of cellular physiology*. 2022; 237(1): 239–257. doi: 10.1002/jcp.30562
- Sagaradze G, Monakova A, Basalova N, Popov V, Balabanyan V, Efimenko A. Regenerative medicine for male infertility: a focus on stem cell niche injury models. *Biomedical journal*. 2022; 45(4): 607–614. doi: 10.1016/j.bj.2022.01.015
- de Rooij DG. The Spermatogonial Stem Cell Niche in Mammals. *Elsevier Inc*. 2015; 99–121. doi: 10.1016/b978-0-12-417047-6.00004-1
- Diao L, Turek PJ, John CM, Fang F, Reijo Pera RA. Roles of Spermatogonial Stem Cells in Spermatogenesis and Fertility Restoration. *Frontiers in Endocrinology*. 2022; 13: 895528. doi: 10.3389/fendo.2022.895528
- Bari E, Ferrarotti I, Torre ML, Corsico AG, Perteghella S. Mesenchymal stem/stromal cell secretome for lung regeneration: The long way through “pharmaceuticalization” for the best formulation. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. 2019; 309: 11–24. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.07.022
- Ghasemi M, Roshandel E, Mohammadian M, Farhadihosseinabadi B, Akbarzadehlaleh P, Shamsasenjan K. Mesenchymal stromal cell-derived secretome-based therapy for neurodegenerative diseases: overview of clinical trials. *Stem cell research and therapy*. 2023; 14(1): 122. doi: 10.1186/s13287-023-03264-0
- Kalinina N, Kharlampieva D, Loguinova M, Butenko I, Pobeguts O, Efimenko A, et al. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res Ther*. 2015; 6: 221. doi: 10.1186/s13287-015-0209-8
- Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 2019; 8(7): 727. doi: 10.3390/cells8070727
- Basalova N, Sagaradze G, Arbatskiy M, Evtushenko E, Kulebyakin K, Grigorieva O, et al. Secretome of Mesenchymal Stromal Cells Prevents Myofibroblasts Differentiation by Transferring Fibrosis-Associated microRNAs within Extracellular Vesicles. *Cells*. 2020; 9(5): 1272. doi: 10.3390/cells9051272
- Monakova A, Sagaradze G, Basalova N, Popov V, Balabanyan V, Efimenko A. Novel Potency Assay for MSC Secretome-Based Treatment of Idiopathic Male Infertility Employed Leydig Cells and Revealed Vascular Endothelial Growth Factor as a Promising Potency Marker. *International journal of molecular sciences*. 2022; 23(16): 9414. doi: 10.3390/ijms23169414
- Sagaradze G, Basalova N, Kirpatovsky V, et al. A magic kick for regeneration: Role of mesenchymal stromal cell secretome in spermatogonial stem cell niche recovery. *Stem Cell Research and Therapy*. 2019; 10(1): 1–10. doi: 10.1186/s13287-019-1479-3
- Yang CC, Chen YT, Chen CH, Chiang JY, Zhen YY, Yip HK. Assessment of doxorubicin-induced mouse testicular damage by the novel second-harmonic generation microscopy. *Am J Transl Res*. 2017; 9(12): 5275–5288.
- Chen Q, Deng T, Han D. Testicular immunoregulation and spermatogenesis. *Seminars in cell and developmental biology*. 2016; 59: 157–165. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.01.019
- Monakova AO, Basalova NA, Balabanyan VYu, et al. The Role of Macrophages in Implementing the Effects of Secretome of Mesenchymal Stromal Cells in the Spermatogonial Stem Cell Niche. *Sovrem Tehnologii Med*. 2025; 17(2): 37–45. doi: 10.17691/stm2025.17.2.04
- Монакова А.О., Басалова Н.А., Попов В.С., Мангушева В.А., Балабаньян В.Ю., Ефименко А.Ю. Тканеспецифичность мезенхимных стромальных клеток в регуляции ниши сперматогонияльных стволовых клеток. *Материалы VI Национального конгресса по регенеративной медицине* [электронный ресурс]. 2024: 667–668. [Monakova AO, Basalova NA, Popov VS, Manguшева VA, Balabanyan VYu, Efimenko AYU. Tissue specificity of mesenchymal stromal cells in the regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Proceedings of the VI National Congress on Regenerative Medicine* [electronic resource]. 2024: 667–668. (In Russ.)]. doi: 10.17816/morph.konf2024
- Sagaradze GD, Basalova NA, Kirpatovsky VI, et al. Application of rat cryptorchidism model for the evaluation of mesenchymal stromal cell secretome regenerative potential. *Biomedicine and pharmacotherapy*. 2019; 109: 1428–1436. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.174
- Ajani EO, Akhigbe TM, Oyedokun PA, Adegbo- la CA, Adeyemi DH, Akhigbe RE. Ferroptotic- and non-fer-

roptotic mechanisms associated with doxorubicin-induced male reproductive dysfunction. *Toxicology Reports*. 2025; 14: 102064. doi: 10.1016/j.toxrep.2025.102064

19. Sheahan BJ, Freeman AN, Keeley TM, Samuelson LC, Roper J, Hasapis S, et al. Epithelial Regeneration After Doxorubicin Arises Primarily From Early Progeny of Active Intestinal Stem Cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2021; 12(1): 119–140. doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.01.015

20. Hou M, Chrysis D, Nurmio M, Parvinen M, Eksborg S, Söder O, et al. Doxorubicin induces apoptosis in germ line stem cells in the immature rat testis and amifostine cannot protect against this cytotoxicity. *Cancer Res*. 2005; 65(21): 9999–10005. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2004

21. Colón E, Zaman F, Axelson M, et al. Insulin-Like Growth Factor-I Is an Important Antiapoptotic Factor

for Rat Leydig Cells during Postnatal Development. *Endocrinology*. 2007; 148(1): 128–139. doi: 10.1210/en.2006-0835

22. Лазарев Р.Е., Монакова А.О., Басалова Н.А., Попов В.С., Ефименко А.Ю. МикроРНК-21 опосредует способность мезенхимных стромальных клеток паракринно стимулировать продукцию тестостерона клетками Лейдига. *Материалы VI Национального конгресса по регенеративной медицине* [электронный ресурс]. 2024: 548–549. [Lazarev RE, Monakova AO, Basalova NA, Popov VS, Efimenko AYU. *MicroRNA-21 mediates the ability of mesenchymal stromal cells to paracrinally stimulate testosterone production by Leydig cells*. Proceedings of the VI National Congress on Regenerative Medicine [electronic resource]. 2024: 548–549. (In Russ.). doi: 10.17816/morph.konf2024

Сведения об авторах

Мнацаканян Анна Олеговна – младший научный сотрудник, Центр регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; e-mail: monakova-anya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7123-6374>

Басалова Наталия Андреевна – кандидат биологических наук, Центр регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; e-mail: natalia_ba@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2597-8879>

Сагарадзе Георгий Дмитриевич – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник, Центр регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; e-mail: georgysagaradze@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2551-5118>

Liang Yingying – аспирант, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; аспирант MSU-BIT University (Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне); e-mail: bella.lyy@qq.com, <https://orcid.org/0009-0006-1864-6557>

Нагибин Николай Викторович – студент, Факультет фундаментальной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; e-mail: nnv2006nik@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0000-4274-8445>

Попов Владимир Сергеевич – кандидат биологических наук, заведующий межфакультетской научно-исследовательской лабораторией трансляционной медицины, Факультет фундаментальной медицины; ведущий научный сотрудник, Центр регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; e-mail: galiantus@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5039-7152>

Ефименко Анастасия Юрьевна – доктор медицинских наук, доцент, профессор РАН, заведующая лабораторией репарации и регенерации тканей, Центр регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; e-mail: efimenkoay@my.msu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0696-1369>

Information about the authors

Anna O. Mnatsakanyan – junior research officer at the Centre for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University; e-mail: monakova-anya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7123-6374>

Nataliya A. Basalova – Cand. Sc. (Biol.), junior research officer at the Centre for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University; e-mail: natalia_ba@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2597-8879>

Georgy D. Sagaradze – Cand. Sc. (Biol.), junior research officer at the Centre for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University; e-mail: georgysagaradze@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2551-5118>

Liang Yingying – PhD student, Lomonosov Moscow State University; PhD student, MSU-BIT University; e-mail: bella.lyy@qq.com, <https://orcid.org/0009-0006-1864-6557>

Nikolai V. Nagibin – student of the Faculty of Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University; e-mail: nnv2006nik@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0000-4274-8445>

Vladimir S. Popov – Cand. Sc. (Biol.), head of Interfaculty Research Laboratory of Translational Medicine Faculty of Medicine, leading research officer at the Centre for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University; e-mail: galiantus@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5039-7152>

Anastasia Yu. Efimenko – Dr. Sc. (Med.), associate professor, professor of the RAS, head of the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration, Centre for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University; e-mail: efimenkoay@my.msu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0696-1369>

Статья опубликована в рамках VII Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных с международным участием «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ В МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ», 22–24 июня 2026 г.