

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной
медицины»

На правах рукописи

Пушкина Варвара Сергеевна

**Морфофункциональное обоснование криоконсервации спермы баранов с
использованием мезенхимальных стволовых клеток**

Специальность 4.2.1. Патология животных, морфология, физиология,
фармакология и токсикология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
ветеринарных наук

Научный руководитель –
доктор ветеринарных наук, доцент
Корочкина Елена Александровна

Санкт-Петербург – 2026

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Строение и морфофункциональные особенности сперматозоидов баранов	12
1.2 Протоколы криоконсервации спермы баранов	15
1.3 Способы повышения криоустойчивости сперматозоидов баранов.....	20
1.4 Биологические основы мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток и их производных.....	26
1.5 Методы выделения, накопления и криоконсервации мезенхимальных стволовых клеток	32
1.6 Заключение по обзору литературы.....	40
Глава 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
2.1 Материалы и методы исследования	41
2.2 Собственные исследования	47
2.2.1 Результаты апробации протокола заморозки спермы баранов	47
2.2.2 Влияние МСК и их производных на качество нативной спермы баранов	50
2.2.3 Эффективность применения мезенхимальных стволовых клеток и их производных в процессе криоконсервации и после оттаивания.....	63
2.2.4 Выделение, накопление и криоконсервация мезенхимальных стволовых клеток баранов.....	74
2.2.5 Определение предельных пассажей культивирования, морфологических и функциональных особенностей мезенхимальных стволовых клеток баранов.....	77
2.2.6 Результаты кариологического анализа и направленной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток	78

Глава 3. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	81
Глава 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	86
4.1 ВЫВОДЫ.....	86
4.2 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	87
4.3 РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	87
4.4 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	89
4.5 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	90

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Овцеводство является одной из экономически выгодных и перспективных отраслей в сельском хозяйстве. Овцеводство развито в Дагестане, Калмыкии, Ставропольском крае, Астраханской области и других регионах России. По состоянию на март 2016 года, в России насчитывается 184 племенных хозяйств, специализирующихся на разведении овец. Из них племенных заводов - 53, племенных репродукторов - 112, генофондных хозяйств - 15, селекционно-генетических центров - 1, селекционно-гибридных центров - 3. По данным Яхьяев, Г. У. (2015), Фириченков, В. Е. и др. (2021), производство баранины за 5 лет увеличилось на 11,3 % или на 46,2 тыс. тонн, за 10 лет рост составил 35,1 % или 118,4 тыс. тонн.

Баранина является источником омега-3 жирных кислот, витамина B12, селена и ниацина. Разведение овец обеспечивает население высококлассной шерстью, используемую для пошива одежды. При этом, существует несколько пород овец многопрофильного назначения, которые могут быть использованы как для производства мяса, так и для производства других продуктов. Например, разведение овец породы Иль-де-Франс способствует получению шерсти и высококачественной шерсти (Ч. А. Монгуш, 2018; В. Г. Двалишвили, 2022).

Как отмечают Лободин, К. А. (2015), Баймишев, Х. Б. и Баймишев, М. Х. (2021), Филатов, А. В. (2022), Федотов, С. В. и Авдеенко, В. С. (2022), Племяшов, К. В. (2024) и др., основой рентабельности любого животноводческого предприятия является воспроизводство. По данным Белобороденко А.М. и др. (2015), половая зрелость овец наступает в 6-8 месяцев. К реализации программы разведения овец и получению приплода (чаще всего – 2-3 ягненка в год), как правило, приступают с 12 месячного возраста, используя искусственное осеменение (Карпенко, Л. Ю. и др., 2023, Иолчиев, Б. С. и др., 2025, Зеленецкий, Н. В. и др., 2025). По данным Иванова, И. И. (1907), Милованова, В. К. (1962), Студенцова, А. П. с соавтор. (2020)

искусственное осеменение является эффективным методом вспомогательных репродуктивных технологий. При проведении данной технологии используют криоконсервацию спермы, которая позволяет сохранить генетический материал от высокоценного производителя (Yoshida, 2000). Сперматозоиды баранов-производителей высокочувствительны к различным изменениям температуры во время процесса замораживания-оттаивания, что негативно отражается на сохранности клеток. Согласно исследованиям Боруновой, С. М. и др. (2020), Айбазова, М. М. и др. (2021), степень повреждения зависит от комбинированного воздействия различных факторов, включая начальную температуру замерзания и скорость охлаждения, поскольку они вызывают образование внутриклеточного льда, что в итоге отражается на подвижности и целостности плазматической мембраны сперматозоидов. В частности, выраженные изменения некоторых показателей качества спермы в процессе криоконсервации были описаны разными авторами: снижение подвижности и жизнеспособности, а также увеличение содержания перекисного окисления липидов и реактивных форм кислорода (Багиров, В. А. и др., 2017; Айбазов, М. М. и др., 2020; Куаншкалиев, Э. Ю. и др., 2022). За последние десятилетия были проведены значительные исследования по разработке разбавителей спермы, оценке семени и ее обработке, протоколов криоконсервации, а также методов замораживания и оттаивания для улучшения жизнеспособности и повышения целостности мембраны сперматозоидов (Salamon and Maxwell 1995a; Salamon and Maxwell, 1995b; Salamon and Maxwell, 2000; Айбазов, М. М. (2003); Корнеенко-Жиляева, Л. В. (2008); Назаров, М. В. и др., (2018)). В этой связи актуальным направлением является поиск и разработка способов, повышающих эффективность использования протоколов криоконсервации спермы баранов-производителей.

Проводя анализ литературных данных, особый интерес вызывает клеточные технологии, в частности мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и их производные. Мезенхимальные стволовые клетки выступают в качестве основополагающего компонента в активно развивающейся регенеративной

терапии. Как отмечают Лаврик, А. А. с соавтор. (2021), Князева, Е. В. с соавтор. (2023), МСК могут выделять ряд биологически активных веществ, таких как хемокины, белки, факторы роста и цитокины, и иметь такие свойства как самообновление и способность к мультипотентной дифференциации. Учитывая данные свойства, МСК можно рассматривать в качестве компонента среды при криоконсервации семени баранов-производителей для повышения переживаемости сперматозоидов в процессе глубокой заморозки и длительного хранения, что повысит процент жизнеспособных и морфологически нормальных клеток в процессе оттаивания и результативность искусственного осеменения овец соответственно (Закирова, Е. Ю. и др., 2023).

Степень разработанности темы. Процесс криоконсервации и его воздействие на качество спермы баранов-производителей отражены во многих работах отечественных и зарубежных авторов, отмечающих наличие криоповреждений, ведущих к изменению уровня фертильности семени после разморозки (Mokarizadeh, A. et al., 2013; Айбазов, М. М. и Мамонтова, Т. В., 2020; Rizkallah, N. et al., 2022). В области андрологии многочисленными исследованиями было установлено положительное влияние МСК на морфофункциональные показатели сперматозоидов разных видов животных (Паюшина, О. В., 2006; Zakirova, E. et al., 2023; Лыков, А. П., 2023; Tanrikulu, M. D. et al., 2025). В то же время, принимая во внимание регенеративный потенциал МСК, их влияние на качество спермы баранов-производителей в качестве компонента среды для криоконсервации, остается не изученным.

Цель и задачи исследования. Цель исследования – разработать способ повышения криорезистентности сперматозоидов баранов с использованием мезенхимальных стволовых клеток.

Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Модифицировать протокол криоконсервации спермы баранов-производителей романовской породы;

2. Определить морфофункциональные особенности МСК, полученных из жировой ткани и костного мозга баранов;
3. Установить протокол использования МСК и сперматозоидов баранов с выявлением регенеративного эффекта;
4. Изучить влияние МСК на качественные показатели спермы баранов-производителей до и после криоконсервации;
5. Проанализировать использование МСК в качестве реабилитационной среды для замороженно-оттаянной спермы баранов.

Научная новизна и ценность полученных материалов. Впервые проведены комплексные исследования по влиянию МСК на физиологические, морфологические и биохимические показатели качества спермы баранов-производителей в процессе замораживания-оттаивания, подобраны протоколы криоконсервации семени и использования МСК. Реализованы выделение и дифференцировка МСК из жировой ткани и костного мозга баранов. Впервые были описаны длительное культивирование культур МСК овец и фиксация изменения в морфологии клеток на больших пассажах культивирования. Получены научно-обоснованные данные о влиянии секрета мезенхимальных стволовых клеток и их производных на замороженно-оттаянную сперму.

Теоретическая и практическая значимость работы. Изучение влияния мезенхимальных стволовых клеток на морфофункциональные показатели сперматозоидов баранов-производителей имеет фундаментальное значение как для теоретических основ андрологии, так и для практического применения в овцеводстве. На основании результатов проведенных научных исследований предложены способы повышения сохранности сперматозоидов в процессе криоконсервации, улучшения их морфофункциональных характеристик после оттаивания.

Практическая значимость исследования обусловлена необходимостью минимизировать процент мертвых и деформированных, с разрушенным генетическим аппаратом сперматозоидов баранов, в процессе глубокой

заморозки и оттаивания. Модифицированный протокол криоконсервации спермы баранов-производителей обеспечивает повышение выживаемости сперматозоидов, а использование мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани и костного мозга баранов, обладают регенеративным действием, оказывающим влияние на структуру сперматозоидов, улучшая морфофункциональные показатели до и после криоконсервации с МСК. Предложенные протоколы могут использоваться в практической деятельности ветеринарного врача и являются основанием для внедрения в клиническую практику, а также в протоколы криоконсервации селекционно-генетических центров по разведению овец с целью улучшения результатов искусственного осеменения. Указанные в работе методы также способствуют созданию своего банка семени, его экспорту и отсутствию зависимости хозяйств от сезонности данного вида животных.

Теоретическая ценность работы заключается в описании структуры сперматозоидов и функциональных характеристик, их изменений в результате влияния осмотического, окислительного стресса и холодового шока, влиянии мезенхимальных стволовых клеток. Материалы исследований могут быть использованы при чтении лекций и проведении практических занятий со студентами по дисциплине «Акушерство и биотехника размножения животных».

Методология и методы исследования. Работа выполнена в период с 2023-2026 гг. на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» в научно-образовательной лаборатории по трансплантации эмбрионов животных. Объектом исследований служили половозрелые бараны романовской породы в возрасте 1,5-2,5 лет. Предметом исследований являлись сперматозоиды баранов-производителей, а также МСК и их производные. Диссертационная работа была основана на анализе научной литературы по данной теме, включая исследования различных авторов. В процессе работы использовалась классическая методология научного исследования, включающая создание контрольной и подопытных групп

животных с учетом принципа аналогичности. Основными целями было определение корректных протоколов криоконсервации спермы баранов-производителей, выделения МСК из жировой ткани и костного мозга овец, формирование протоколов использования МСК до и после криоконсервации спермы баранов-производителей и изучение влияния МСК при этих процессах на морфофункциональные показатели сперматозоидов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Модифицированный протокол криоконсервации спермы баранов-производителей обеспечивает повышение выживаемости клеток;
2. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), полученные из жировой ткани и костного мозга баранов, обладают морфофункциональными особенностями;
3. МСК обладают регенеративным действием, оказывающим влияние на структуру сперматозоидов;
4. МСК улучшают морфофункциональные показатели сперматозоидов баранов до и после криоконсервации с МСК;
5. МСК можно использовать в качестве реабилитационной среды для замороженно-оттаянной спермы баранов.

Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность результатов диссертационной работы основывается на подборе аналогичных групп животных, использовании современных методов исследований, повторности оценки образцов, сравнении полученных данных. Статистическая обработка данных была проведена при помощи программы Stattech и Medstatistic «Медицинская Статистика» с вычислением показателей вариационного ряда и t-критерий Стьюдента. Работа выполнена в период с 2023-2026 гг. в научно-образовательной лаборатории по трансплантации эмбрионов животных на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины».

Результаты исследований были представлены на российских и международных конференциях: 13-я международная научная конференция

студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны» (г. Санкт-Петербург, 2024); 14-я международная межвузовская конференция по клинической ветеринарии (г. Москва, 2024); международная научно-практическая конференция (г. Махачкала, 2024).

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00157, <https://rscf.ru/project/23-26-00157/>

Публикация результатов исследований. По теме диссертационной работы опубликовано 11 научных трудов: в сборниках материалов всероссийских и международных конференций, центральных журналах и отдельных изданиях. Из них в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ для опубликования основных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук – 7 работ (Международный вестник ветеринарии – 2; Ветеринария – 3; Ветеринария и кормление – 1; Вестник Красноярского государственного аграрного университета – 1); в индексируемой базе цитирования Scopus – 1; в региональной печати – 3.

Личный вклад. Диссертационные исследования проводились автором в период с 2023 по 2026 годы. Постановка цели, задач, анализ полученных данных и их интерпретация, осуществлялись совместно с научным руководителем. Личный вклад соискателя заключается в непосредственном проведении всех этапов диссертационного исследования: поиск и анализ литературных источников, применение морфологических методик исследования, определения и апробации актуальных протоколов криоконсервации и использования мезенхимальных стволовых клеток. Личный вклад соискателя в проведенных исследованиях и их анализе составляет 90%.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту научной специальности 4.2.1. Патология

животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология: пункты 2, 13.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственного исследования, выводов, практических предложений, рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки темы, списка использованной литературы, включающего 77 наименований отечественных и 184 наименований иностранных авторов. Работа содержит 4 таблицы и 16 рисунков.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Строение и морфофункциональные особенности сперматозоидов баранов

За последние два десятилетия возросло число исследований, касаемых видовых особенностей сперматозоидов разных животных. Сперматогенез происходит внутри зародышевого эпителия, тогда как клетки Лейдига в интерстициальной ткани отвечают за выработку гормонов. Гаметы баранов, как и сперматозоиды других млекопитающих, представляют собой высокоспециализированную клетку, состоящую из головки, средней части и хвоста (Баймишев, Х. Б., 2008).

Головка состоит из ядра и мембраны с акросомой. Акросома крупная, занимает около 40–70 % площади головки. Она содержит гидролитические ферменты (акрозин, гиалуронидазу и лизиновую оболочку), необходимые для прохождения сперматозоидов через оболочки яйцеклетки в процессе оплодотворения (Van de Hoek, M., 2022, Габедава, М. А. и др., 2024).

Акросомальная реакция сперматозоидов млекопитающих является существенным фактором оплодотворения (Юлдашбаев, Ю. А. и др., 2021). У баранов акросомная реакция проходит быстрее, чем у других сельскохозяйственных животных (Ryusaku, D., 2018).

Ядерный материал представляет собой высококонденсированный хроматин, защищенный от повреждений, и имеет ограниченную способность к репликации или экспрессии генов из-за плотной упаковки. В сперматозоиде барана содержится 27 хромосом (Мамонтова, Т. В. и др., 2017). Длина и ширина головки составляют 7-9 мкм и 4-5 мкм. Было изучено влияние возраста самца на структуру верхней части половой клетки. Так, наибольшее значение длины головки сперматозоида было зафиксировано в самой старшей возрастной категории, в среднем $8,54 \pm 0,24$ мкм. На втором месте находятся бараны среднего возраста - $7,95 \pm 0,35$ мкм. За ними следуют самые молодые самцы со средним значением длины - $7,91 \pm 0,35$ мкм. Ширина головки имела следующие средние значения: $4,49 \pm 0,15$ мкм в самой молодой категории, $4,51$

$\pm 0,18$ мкм в категории среднего возраста и $4,90 \pm 0,21$ мкм в самой старой категории (Makki Khalaf Hussein A.L. Dulaimi, 2015). Также наблюдается сезонное изменение в размере сперматозоидов (Айбазов, А. М., 2022). Осенью и зимой клетки становятся больше, по сравнению с таковыми весной и летом, поскольку мелкий рогатый скот – сезонно-полициклические животные (Bravo, J.A., 2014; Мамонтова, Т. В. и др., 2017).

Шейка или средняя часть содержит митохондрии, которые продуцируют энергию для движения хвоста. В области средней части внешние плотные волокна окружены митохондриальной оболочкой, тогда как в основной части плотные волокна окружены фиброзной. Данные органеллы окружают аксонему, группу микротрубочек, которые проходят по всей длине просвета жгутика через основную и концевую части. Центральная пара и девять дублетов микротрубочек, которые составляют аксонему, окружены девятью плотными волокнами. Общее значение расположения системы микротрубочек жгутика заключается в том, что последовательное и скоординированное сокращение соседних дублетов в сочетании с закреплением дублетов и плотных волокон позволяет изгибать жгутик. Изгиб аксонемы является причиной движения хвостовой части сперматозоида и, следовательно, подвижности сперматозоида (Vishwanath, R., 1992).

Что касается подвижности, процент прогрессивно подвижных клеток у баранов должен быть более 30 % для оценки «удовлетворительно» и более 70 % для оценки «отлично» (Kimberling and Parsons, 2007). Скорость движения высокая (до 100–120 мкм/с), что связано с высокой метаболической активностью митохондрий. В эякуляте баранов содержится большое количество сперматозоидов (3–5 млрд/мл), повышая шансы оплодотворения. В сперме, подвергнутой холодовому или химическому шоку, часто можно наблюдать маневрное или колебательное движение половых клеток. Подвижность сперматозоидов может быть снижена вне сезона размножения, что также указывает на сезонную полициклическость данного вида животных (Peter J. Chenoweth and Steven P. Lorton, 2021; Юлдашбаев, Ю. А. и др., 2021).

Морфология сперматозоидов баранов может зависеть от возраста, сезона и заболеваний репродуктивного тракта. Бараны должны иметь не менее 70 % нормальных сперматозоидов, чтобы их можно было отнести к удовлетворительным потенциальным производителям, или более 80–90 % для причисления к группе востребованных особей. При проведении сбора материала летом, можно ожидать, что процент отклонений будет выше. Бараны, подвергавшиеся воздействию умеренной жары, могут показывать незначительную степень отклонений в морфологии спермы, что тесно связано с низким уровнем оплодотворения и высокой частотой ранней эмбриональной смерти (Rathore, 1968; Skalet et al. 1988; Ибишов, Д. Ф. и Ситева, Л. Н., 2013). В одном исследовании было продемонстрировано, что у молодых самцов - 65 % отклонений от нормы в начале полового созревания, которые снизились до 12 % к 8 месяцам. Было отмечено, что некроспермия у молодых самцов чаще встречается весной и летом, чем осенью и зимой (Ahmad and Noakes, 1996; Медведев, Г. Ф. и Валюшкин, К. Д., 2010).

Сперматозоиды баранов обладают низкой устойчивостью к понижению температуры и другим факторам окружающей среды, что важно для криоконсервации спермы. Несмотря на обширные разработки в отношении используемых разбавителей, модификации процессов охлаждения и замораживания, данная процедура все еще способна наносить значительный ультраструктурный, биохимический и термический ущерб, что приводит к снижению или изменению показателей фертильности после размораживания. Термическое воздействие, также известное как холодовой шок, усиливается у баранов из-за низкого внутримембранного соотношения холестерина к фосфолипидам, присутствующего в мембране половых клеток. Повреждение холодовым шоком может снизить подвижность и жизнеспособность сперматозоидов барана до 60 % после размораживания. При этом результативность проведения искусственного осеменения составляет 20-30% (Sathe, S. R., 2018). Сперматозоиды также восприимчивы к вредному воздействию реактивных форм кислорода в первую очередь из-за

значительного присутствия ненасыщенных жирных кислот в их клеточных мембранах. Данная форма кислорода способствует перекисному окислению липидов, что приводит к потере целостности мембраны и, следовательно, увеличению проницаемости (Pasciu, V. et al., 2023). Кроме того, сперматозоиды баранов особенно уязвимы к окислительным процессам, поскольку их клеточные мембраны содержат большое количество полиненасыщенных жирных кислот (ПЖК), чувствительных к перекисному окислению липидов. Более того, эти клетки обладают значительным количеством митохондрий, которые играют решающую роль в обеспечении необходимой энергии для моторики сперматозоидов. Однако митохондрии также являются основным источником реактивных форм кислорода. Данные процессы наносят значительный ущерб и способствуют нарушению оплодотворяющей способности, поскольку целостность мембраны сперматозоидов необходима для прохождения акросомальной реакции (Chianese, R. и Pierantoni, R., 2021; Гнездилова, Л. А. и др. 2020).

Исходя из вышесказанного, сперматозоиды баранов высокочувствительны к влиянию окружающей среды, особенно к разнице температур, поскольку содержат низкое внутримембранное соотношение холестерина к фосфолипидам. Также, качественные показатели спермы во многом зависят от возраста, сезона и различных заболеваний репродуктивной системы баранов. Данные факты могут быть причиной снижения фертильности или приводить к уменьшению процента жизнеспособных клеток в период инкубации и криоконсервации. Для предотвращения пагубных воздействий окружающей среды разработаны различные протоколы и средства для сохранности половых клеток перед осеменением.

1.2 Протоколы криоконсервации спермы баранов

Криоконсервация спермы баранов способствует генетическому прогрессу овцеводческой отрасли. Технология заморозки в значительной степени обеспечивает сохранение генетического материала и устраняет

географические барьеры в применении искусственного осеменения (Епишина, В. И. и Епишина, Т. М., 2008).

Процесс замораживания-оттаивания делится на два метода: медленное замораживание и витрификация. Первый способ - постепенное удаление воды из клеток, а второй - мгновенное замораживание без кристаллизации. Поскольку криоконсервация необходима для обеспечения качественного и долгосрочного хранения семени, были выведены основные моменты с дальнейшими корректировками.

Разработка протоколов криоконсервации является актуальным научным направлением. Так, известны исследования в данной области Багирова, В. А. (2017), Айбазова, М. М. (2020), Мамонтовой, Т. В. (2021).

По данным National Animal Germplasm Program (NAGP) протоколы криоконсервации спермы баранов включает в себя следующие этапы: 1. образцы спермы баранов-производителей разбавляют средой до концентрации 400×10^6 сперматозоидов/мл и охлаждают до $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 90-120 минут; 2. загружают в соломинки объемом 0,5 мл; 3. замораживают. Замораживание возможно осуществить одним из двух способов:

1) Замораживание в боксе: образцы помещают на штатив и замораживают в парах жидкого азота (на 4 см выше жидкого азота) в течение 10 минут и погружают в жидкий азот для хранения;

2) Замораживание с помощью морозильника: образцы замораживают с использованием автоматической системы для криоконсервации: от $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ при $+5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$; от $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ при $+60\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$, а затем погружают в жидкий азот для хранения.

Оттаивание производят в течение 30 секунд на водяной бане при $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Purdy P., 2017).

Айбазов, М. М. с соавтор. (2021) проводили постепенную криоконсервацию спермы баранов. Материал был получен от 5-ти баранов. Каждый образец разбавляли в соотношении 1:3. Далее была произведена упаковка в пайетты объемом 0,25 мл. После чего сперму эквilibрировали в

течение 180 мин. при + 4 °С. Соломинки замораживались в парах жидкого азота (Т 85-95 °С). Замораживание производилось поэтапно, после чего соломинки размещали в гоблеты и погружали в жидкий азот (-196 °С). Оттаивание производили при температуре 38 °С в течение 30 секунд. Размороженную сперму из каждой соломинки смешивали с 0,5 мл. предварительно подогретого до + 35 °С физиологического раствора с рН 7,0 и инкубировали в термостате в течение нескольких часов. Процент сперматозоидов без повреждений после оттаивания в среднем составил около 36,9 %. При дальнейшем размораживании этот показатель уменьшался в связи с гибелью сперматозоидов и их структурными изменениями.

Был создан протокол, согласно которому после разбавления сперму медленно охлаждают до + 5 °С в течение 1,5–2 часов, упаковывают и замораживают в парах жидкого азота. Окончательное разведение спермы перед криоконсервацией обычно составляет от 100 до 200 млн сперматозоидов/мл. Криопротекторы добавляют в один или два этапа (после охлаждения). Скорость замораживания, используемая для криоконсервации спермы мелких жвачных, находится в диапазоне от -10 °С до -100 °С/мин (Tibary, A. и Manago, S., 2018).

В исследовании сравниваются протоколы замораживания спермы баранов-производителей в парах азота с начальной низкой скоростью охлаждения на первом этапе, за которой следует более высокая скорость охлаждения с образованием кристаллов льда. Сперму, полученную от 12-ти взрослых баранов, разбавляли и замораживали в разведении 100×10^6 сперматозоидов/мл, используя три протокола заморозки. Суть первого состояла в трехступенчатом замедленном охлаждении; второго протокола - в трехступенчатом ускоренном охлаждении. В третьем протоколе использовалось двухступенчатое ускоренное охлаждение: от + 5 °С до -10 °С (5 °С/мин.), а затем от -10 °С до -130 °С (60 °С/мин.). В конце каждая проба помещалась в жидкий азот (-196 °С). Все замороженные образцы размораживали, помещая соломинки в водяную баню при 37 °С на 30 секунд.

Качество спермы после размораживания было снижено во всех протоколах ($p < 0,05$) по сравнению со свежеполученной. Процент характеристик подвижности сперматозоидов после оттаивания и сперматозоидов с неповрежденной плазматической мембраной, неповрежденной акросомой и неповрежденной митохондриальной мембраной были выше при использовании третьего протокола, чем при первом ($p < 0,01$) и втором ($p < 0,05$). Кроме того, процент сперматозоидов с фрагментированной ДНК после оттаивания был ниже ($p < 0,05$) при использовании третьего протокола по сравнению с первым (Diego, A., 2019).

Было проведено исследование по сбору спермы баранов ($n = 12$) с помощью электроэякуляции. Каждую пробу разбавляли в соотношении 1:10. Затем проводили упаковку в соломинки (0,25 мл), помещали в штативы и эквилибрировали в холодильнике при 4 °C в течение 6 ч. Программа замораживания запускалась автоматически. После чего пары азота заполняли бокс для обеспечения следующего температурного профиля (+ 4 °C, -10 °C (120 с), -80 °C (450 с), -120 °C (100 с) и -140 °C (180 с). По истечении установленного времени соломинки для спермы погружали в жидкий азот (-196 °C). Далее образцы размораживали. Согласно результатам проведенных исследований, данный режим криоконсервации подходит для спермы баранов-производителей и способствует сохранению структуры половых клеток (Vozař, J. et al, 2020).

После отбора семени из придатков семенников баранов ($n=25$), образцы центрифугировали при 70000 оборотов в течение 10 минут; затем суспензия спермы помещалась в раствор Трис на 15 минут, и далее производилась оценка полученного материала. Сперма с подвижностью, равной 80 % или выше и общей частотой морфологической аномалии, равной 10 % или менее была разбавлена до конечной концентрации 250×10^6 сперматозоидов/мл. Разбавитель включал в себя 2,71 г. Трис, 1,4 г. лимонной кислоты и 1 г. фруктозы, разведенной в 100 мл. дистиллированной воды, содержащей 7 % глицерина и 20 % яичного желтка. Сперму с подвижностью менее 80 % и

общими аномалиями более 10 % также разбавляли. Материал охлаждался до 4 °C в течение 2 часов, а затем упаковывался в соломинки объемом 0,25 мл. Образцы погружались в жидкий азот после того, как удерживались на 4 см выше температуры жидкости в течение 7 минут. Соломинки размораживали при 37 °C в течение 30 с. в водяной бане после замораживания не менее 4 недель, а затем сперма была извлечена и проанализирована. Морфология спермы существенно не изменилась (Najafi, A. et al., 2023).

Образцы спермы с хорошей исходной подвижностью, полученные от взрослых баранов, объединяли, разбавляли до 1×10^9 сперматозоидов/мл с помощью разбавителя Eggyolk-Test-glycerol и упаковывали в соломинки 0,25 мл. Соломинки первой группы охлаждали в программируемом морозильнике от 25 °C до 5 °C со скоростью 0,15 °C в минуту с последующей выдержкой в течение 2 ч. для уравнивания, соломинки второй группы медленно охлаждали до 5 °C и уравнивали в течение 2 ч в холодильной камере. После соломинки 2-й группы также загружали в морозильную камеру для замораживания соломинок обеих групп одновременно от + 5 °C до -125 °C со скоростью 25 °C в минуту. Оттаивание проводили при + 50 °C в течение 10 секунд. Процент подвижности, количество быстроподвижных сперматозоидов и сперматозоидов с нормальной акросомой были значительно ($P < 0,05$) выше в 1-ой группе по сравнению со 2-ой группой. Результаты показали, что контролируемая скорость охлаждения обеспечивает высокую криоустойчивость сперматозоидов в процессе криоконсервации по сравнению с неконтролируемой скоростью охлаждения (Kumar D. et al., 2009).

Таким образом, сбор, оценка и подготовка спермы являются важными этапами в процессе криоконсервации, также как и сам протокол разморозки-заморозки спермы. Сама процедура криоконсервации спермы баранов-производителей представляет сложную технологию, которая характеризуется низкой результативностью и зависит от индивидуальных особенностей производителя. Актуальным протоколом криоконсервации является взятие, центрифугирование (режим: 7000 об/мин в течение 15 минут), последующее

удаление семенной плазмы, разбавление в соотношении 1:4 OptiXcell (IMV, Франция), охлаждение при температуре + 4 °C в течение 1,5 часов. Протокол заморозки: 1 шаг – 4 см над жидким азотом на 10 минут (-70 °C); 2 шаг – полное погружение в жидкий азот. Оттаивание спермы производилось при температуре + 37 °C в течение 30 сек.

1.3 Способы повышения криоустойчивости сперматозоидов баранов

Технология искусственного осеменения включает несколько преимуществ, улучшая коэффициент использования востребованных по генетике самцов-производителей, увеличивая результативность искусственного осеменения, предотвращая распространение инфекционных заболеваний репродуктивной системы (Кустов, В. В. и др., 2024). Эффективность искусственного осеменения также тесно связана с качеством спермы. Существует несколько факторов, влияющих на морфофункциональные показатели и жизнеспособность сперматозоидов, включая методы сохранения спермы, компоненты разбавителей, антибиотики, частоту сбора спермы и протоколы криоконсервации (Gil, J., 2003).

Использование антиоксидантных соединений (глутатиона, каталазы, витамина Е, цистеина) является одним из ведущих инструментов для улучшения протоколов криоконсервации спермы баранов-производителей (Ерохин, А. С. и др., 1996). Криоконсервация вызывает различные виды повреждения сперматозоидов, и многие из этих вредных эффектов вызваны окислительно-восстановительной дерегуляцией.

Семенная плазма содержит как ферментативные, так и неферментативные антиоксиданты. Ферментативные антиоксиданты, обнаруженные в семенной плазме, включают: супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу. К неэнзимным антиоксидантам, присутствующим в семенной плазме, относятся: витамины А и С, карнитин, глутатион и пируват. Данные вещества работают совместно для поддержания баланса в семенной среде, защищая сперматозоиды от окислительного повреждения. По этой причине широко используются антиоксидантные добавки в протоколах

заморозки-разморозки спермы для снижения уровня реактивных форм кислорода и для уравнивания окислительно-восстановительного статуса (Кудинова, С. П., 2015; Eidan, S. M., 2016; Kameni, S. L. et al., 2021).

Был проведен мультипараметрический анализ некоторых антиоксидантов (кроцин, глутатион и тролокс), зафиксировано положительное влияние антиоксидантной терапии на жизнеспособность спермы. Так, при добавлении тролокса улучшалась фертильность спермы баранов-производителей (Marta F. Riesco et al., 2021).

Витамин Е является эффективным антиоксидантом. Регенерация радикалов витамина Е до их активной формы облегчается присутствием витамина С или убихинола. Данные антиоксиданты, включая витамин С, Е и убихинол, признаны цепными антиоксидантами, эффективно нейтрализуя липидные пероксидные и алкильные радикалы. Неблагоприятное воздействие на подвижность и жизнеспособность спермы, вызванное реактивными формами кислорода во время процессов криоконсервации и размораживания спермы, может быть снижено с помощью добавок витамина Е в разбавителях. Предполагается, что оптимальная дозировка составляет 10 ммоль/л, как указано в различных исследованиях (Гущин, А. И. и Копылов, С. Н., 2014; Berean, D.I. et al, 2024).

Внутриклеточная кристаллизация льда в процессе замораживания является основной причиной повреждения клеток. Глицерин широко применяется для криоконсервации сперматозоидов. Тем не менее, глицерин, при использовании в высоких концентрациях, имеет некоторые токсические эффекты, а также может способствовать наибольшему осмотическому повреждению плазматической мембраны, поскольку его проницаемость через плазматическую мембрану спермы намного ниже, чем у многих других криопротекторов (Awad, M. M., 2011; Alcaay, S. et al., 2016; Озтерклер, Й. и Ари, У. Ц., 2017). Кроме того, низкомолекулярные криопротекторы, такие как диметилсульфоксид, этиленгликоль и пропандиол могут наносить меньшее повреждение, так как они легче уравниваются через мембрану, чем

глицерин, и, следовательно, вызывают гораздо меньше повреждений, чем глицерин (Moore, et al., 2006; Awad, M. M., 2011; Silva, et al., 2012).

Яичный желток используется в непроникающих криопротекторах, которые успешно защищают морфофункциональные характеристики сперматозоидов (подвижность, жизнеспособность и целостность акросомы) после размораживания, в то время как глицерин является наиболее часто используемым проникающим криопротектором (Rekha A. et al., 2015, 2016). В глицерине концентрация, обеспечивающая наилучшую выживаемость после оттаивания, составляет от 3 % до 7 %, в то время как в яичном желтке она составляет от 5 % до 20 % (Anel, L. et al., 2003).

В Норвегии и Швеции стандартный протокол криоконсервации спермы барана состоит из двухэтапного метода разбавления. Сначала сперму разбавляют средой без глицерина (фракция 1) и охлаждают до 5 °С, затем дополнительно разбавляют 1:1 разбавителем (фракция 2) с концентрацией глицерина 14 %, что дает конечную концентрацию 7 %. Ее уравнивают в течение 2-х часов, центрифугируют для повторного концентрирования спермы до 200×10^6 сперматозоидов/доза, упаковывают в мини-соломинки по 0,25 мл и, наконец, замораживают (Gil, J., 2003).

В другом исследовании было доказано отрицательное влияние 6 % диметилсульфоксида на морфофункциональные параметры спермы после оттаивания и эмбриональное развитие плодов. При этом, этиленгликоль и пропандиол оказали успешное протективное действие на акросомную целостность и сохранность ДНК. Глицерин обеспечивал лучшую криопротекцию подвижности сперматозоидов и целостности плазматической мембраны (Alsay, S. et al., 2016).

Действие двух криопротекторов (глицерин, этиленгликоль) и комбинаций криопротектантов/трегалозы на замороженные-размороженные сперматозоиды было исследовано на ультраструктурном уровне. Для данной цели эякуляты, собранные от баранов, были объединены и разбавлены средой на основе Триса, содержащей добавки, включая 5,0 % глицерин, 3,0 %

глицерин +60 мМ трегалозы, 1,5 % глицерина +100 мМ трегалозы, 5,0 % этиленгликоля, 3,0 % этиленгликоля +60 мМ трегалозы и 1,5 % этиленгликоля +100 мМ трегалозы. Количество неповрежденных сперматозоидов в группах, содержащих 5,0 % этиленгликоля и 1,5 % этиленгликоля +100 мМ трегалозы, было выше, чем в других группах ($p < 0,05$). В результате было высказано предположение, что группы из 5,0 % этиленгликоля и 1,5 % этиленгликоля +100 мМ трегалозы обеспечили самую высокую защиту ультраструктурной морфологии замороженных-размороженных сперматозоидов баранов по сравнению с другими группами (Keskin, N., 2020).

Образцы ($n=16$) от четырех баранов были разбавлены средой Трис с добавлением желтка, также в составе: глицерин (5 %), этиленгликоль (3 % или 5 %) или ацетамид (3 % или 5 %); и заморожены при -196°C . После оттаивания прогрессивная подвижность сперматозоидов была выше ($P < 0,05$) при криоконсервации с глицерином 5 % и этиленгликолем (3 % или 5 %), чем при ацетамиде (3 % или 5 %). Целостность акросомы была выше ($P < 0,05$) с этиленгликолем 5 %, чем ацетамидом (3 % или 5 %). Процент сперматозоидов без окислительного стресса был больше ($P < 0,05$) с этиленгликолем (3 % или 5 %), чем с ацетамидом (3 % или 5 %). Целостность плазматической мембраны была выше с глицерином 5 % ($P < 0,05$), чем с другими криопротекторами. Таким образом, можно сделать вывод, что глицерин 5 % и этиленгликоль (3 % или 5 %) защищают сперматозоиды от вредных последствий замерзания, а также, что глицерин 5 % обеспечивает большую защиту плазматической мембраны спермы (Silva, et al., 2012).

Центрифугирование спермы является распространенной процедурой обработки эякулята в процессе предподготовки перед криоконсервацией и искусственным осеменением и в других вспомогательных репродуктивных технологиях. При этом, важен протокол центрифугирования, поскольку данная процедура может пагубно воздействовать на функцию сперматозоидов баранов при использовании высоких скоростей. В одном исследовании провели три эксперимента на тему влияния центрифугирования. В первом

оценивалось влияние процедуры центрифугирования с двумя разбавителями (INRA 96 и Tyrode's) и двух протоколов охлаждения (быстрое и медленное охлаждение от -35°C до 15°C) на качество сперматозоидов (подвижность, жизнеспособность, апоптоз и митохондриальная активность). Комбинация INRA 96 с медленным охлаждением и Tyrode's при комнатной температуре показала самые высокие значения качества сперматозоидов ($P \leq 0,05$). В эксперименте 2 оценивалось влияние трех центробежных сил (600, 1200 и 6000 $\times g$ в течение десяти минут) непосредственно после центрифугирования на технические характеристики и функциональность сперматозоидов в разбавленных образцах с INRA 96 и раствором Тирода в условиях, установленных в эксперименте 1. Наименьший вес осадка ($P \leq 0,05$) без вредного воздействия на физиологическое состояние сперматозоидов ($P > 0,05$) был достигнут при 1200 $\times g$, поскольку 6000 $\times g$ вызывало ухудшение подвижности сперматозоидов ($P \leq 0,05$) при использовании обоих растворителей. Наконец, в эксперименте 3 было проведено комбинированное исследование *in vitro* и *in vivo* влияния этих трех центробежных сил на качество спермы баранов после разбавления (INRA 96) и хранения в жидкой среде (от шести до восьми часов при 15°C). Повреждение подвижности сперматозоидов, вызванное центрифугированием при 6000 $\times g$ ($P \leq 0,05$), сохранялось с течением времени, что совпадало со снижением фертильности ($P \leq 0,05$). В заключение, половые клетки могут быть отцентрифугированы с разбавителем INRA 96 1200 $\times g$ в течение 10 минут при 15°C в качестве безопасных значений с высокими темпами восстановления и без негативного воздействия на качество и фертильность спермы (Neila-Montero M. et al., 2022).

Более низкие скорости центрифугирования предпочтительнее высоким. Например, центрифугирование с 800 - 1000 $\times g$ в течение 10–15 минут при $15-20^{\circ}\text{C}$, поскольку более высокие скорости ($>1200 \times g$) приводят к механическому повреждению акросомы и хвостов сперматозоидов. Длительное центрифугирование (>20 мин) снижает подвижность, а повторное центрифугирование увеличивает окислительный. После центрифугирования

семенная плазма аккуратно удаляется, оставляя осадок сперматозоидов, поскольку она содержит протеазы и ферменты, которые могут повреждать половые клетки при длительном хранении (Корочкина, Е. А., 2025).

На переживаемость сперматозоидов во время криоконсервации также влияет скорость заморозания и оттаивания. Чтобы свести к минимуму криотравмы, такие как нарушение структуры плазматической мембраны и ДНК, вызванные значительным внутриклеточным образованием льда, а также изменениями внутриклеточного pH и ионного состава, необходимо определить соответствующую скорость охлаждения (Saha, A. et al., 2022).

Быстрое охлаждение спермы от 30 до 40 °C вызывает повреждение «холодным шоком». Изменения температуры во время охлаждения вызывают нагрузку на мембрану сперматозоидов, вызывая фазовые сдвиги липидов и изменение функционального состояния мембраны. Известно, что температура от 5 °C до -15 °C вызывает значительное повреждение. Соответствующая скорость замораживания для минимизации внутриклеточного образования кристаллов льда должна быть достаточно медленной, чтобы позволить воде покинуть клетки, но достаточно быстрой, чтобы предотвратить сильное обезвоживание клеток.

Для предотвращения холодного шока сперматозоидов, первоначальное разбавление спермы охлаждают до 5 °C в течение нескольких часов (1,5 - 2,0) путем постепенного добавления разбавителей, смешивания их и поддержания смеси близкой к температуре тела (Chaveiro, A. et al., 2006; Shipley, C. F. B. et al., 2007).

Перед тем, как подвергать клетки гиперосмотическим условиям, вызванным обезвоживанием, скорость охлаждения должна быть достаточно медленной, чтобы обеспечить достаточное клеточное обезвоживание, и все еще достаточно быстрой, чтобы заморозить оставшуюся внутриклеточную жидкость (Medeiros, C. M. O. et al., 2002).

Для достижения высокого уровня фертильности с наименьшим количеством спермы образец должен быть надлежащим образом разбавлен.

Разбавитель должен иметь максимальную растворимость в воде и минимальную растворимость во всех других средах, с низкой концентрацией буфера, низкотемпературным эффектом, качественно поведенными катионными взаимодействиями, более высокими ионными силами и химической стабильностью. Среди комбинаций разбавления, Tris - среды рекомендуются для рутинного использования для криоконсервации спермы баранов (Azizunnesa, A. et al., 2014; Rekha, A. et al., 2016).

Во избежание риска микробиологического загрязнения, многие исследователи используют соевый лецитин вместо яичного желтка в разбавителях (Forouzanfar, M., 2010).

Добавление трегалозы или раффиноза повышает его криопротекторную активность. Bioxcell (на основе соевого лецитина) и AndroMed являются коммерческими разбавителями, используемыми для замораживания спермы. Основой является среда Tris, а также фосфолипиды, лимонная кислота, углеводы, антиоксиданты и глицерин (Fukui, Y. et al., 2008).

Любые изменения в протоколах или составе разбавителей могут повлиять на качество спермы после разморозки. Основными способами повышения криоустойчивости спермы баранов-производителей является применение антиоксидантных соединений, определение скорости охлаждения, центрифугирование и удаление семенной жидкости, поэтапная заморозка, использование криопротекторных сред. Разработка новых протоколов криоконсервации и методов оценки криоконсервированной спермы баранов-производителей увеличит процент выживаемости половых клеток.

1.4 Биологические основы мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток и их производных

За последние несколько лет был получен большой объем информации о типах стволовых клеток, их биологической природе, поведении *in vitro* и *in vivo* и потенциальном применении в исследованиях и терапии (Гуляева, Т. А., 2022).

МСК являются важным компонентом регенеративной медицины. Это можно объяснить их разнообразными и многочисленными доступными

источниками, а также простотой процедур изоляции. Данные клетки устойчивы к воздействию физических и химических факторов с отсутствием возникновения пороков развития и функциональными аномалиями и несут ограниченные этические проблемы (Zuk et al., 2001; Сабурин, И. Н. и др., 2015; Cardoso et al., 2017; Таюрский, М. С. и Мантатова, Н. В., 2024).

Дополнительные характеристики, такие как способность корректировать работу иммунной системы и обеспечивать противовоспалительный ответ, тем самым восстанавливая ткань без образования рубцов, делают их более подходящими для регенеративной медицины (Zuk et al., 2001; Stewart and Stewart 2011; Gugjoo et al., 2019; Алексеев, К. Д. и Пименов, Н. В., 2022). Однако МСК имеют ограниченную продолжительность жизни в культуре, и после определенных от числа пассажей культуры, эти клетки становятся стареющими (Caplan 2012; Шафигуллина, С. Д., 2025). Даже при имплантации *in vivo* МСК выживают только в течение определенного периода (от нескольких часов до 90 дней) (Guest et al., 2010; McDuffee et al., 2012).

Основные свойства, представленные самообновлением и дифференциацией МСК, плохо изучены и даже подвергались сомнению. Только несколько генов поддерживают маркеры самообновления и дифференциации МСК. До сих пор не было определено ни одного ключевого фактора транскрипции для МСК, в отличие от плюрипотентных генов, таких как Oct4, Nanog и Sox2, которые приписываются эмбриональным стволовым клеткам. Несколько высокоэкспрессируемых генов, включая девять факторов транскрипции в недифференцированных МСК, были обнаружены после сравнения недифференцированных и трехлинейных дифференцированных МСК. Однако индивидуальное подавление таких генов могло лишь частично снизить пролиферацию клеток или их дифференциацию (Kubo et al., 2009; Савченкова, И. П. и Гулюкин, М. И., 2011).

Существует определенная специфика МСК:

1. Клеточная гетерогенность в отношении вида, возраста, источников, условий культивирования и количества пассажей культуры (Mareddy et al., 2010; Menicanin et al., 2010);

2. МСК имеют конечную продолжительность жизни культуры, характеризующуюся старением после определенного числа пассажей. МСК демонстрируют морфологические аномалии, ослабленную экспрессию специфических поверхностных маркеров, сниженный потенциал дифференциации и остановку пролиферации (Baxter et al., 2004; Wagner et al., 2008; Liu, M. 2013);

3. Плохое понимание микросреды, которая контролирует особенности МСК. Необходимо изучить влияние окружающей среды. Среди различных изученных влияний можно отметить гипоксию (Drela et al., 2014; Hu et al., 2014; Fotia et al., 2015), доступный внеклеточный матрикс (ECM) (Xiong et al., 2015; Wong et al., 2017), механические и гуморальные факторы роста (Terraciano et al., 2007; Bottagisio et al., 2015; Hu, 2015).

Свойство самообновления позволяет восстанавливать поврежденные клетки или производить замену нефункционирующих. Данная особенность стволовой клетки отличает ее от клетки-предшественника, поскольку последняя, хотя и способна дифференцироваться, но не способна к самообновлению. Самообновление МСК происходит посредством симметричных или асимметричных делений. Благодаря симметричным делениям родительская клетка способна производить идентичные копии, то есть дочерняя клетка копирует весь геном. При асимметричных делениях две клетки будут различны по форме и составу (Wilson и Trump 2006; Осипова, Н. И., 2006; He et al., 2009).

При различиях окружающей среды материнская клетка подвергается воздействию множественных факторов, что изначально приводит к симметричному делению, производящему идентичные копии. Затем одна из дочерних стволовых клеток подвергается асимметричному делению, генерируя неидентичные клетки для выполнения тканеспецифической

функции (Spradling et al., 2001; Ohlstein et al., 2004). Этот процесс известен как дифференциация и регулируется микросредой. Факторы роста и цитокины, такие как IGF-1, TGF- β 1, BMP-1 и т. д., могут способствовать пролиферации стволовых клеток или их ингибированию (Fuchs et al., 2004; Potten et al., 2009; Spees et al., 2016). Микросреда, как правило, играет существенную роль в поддержании свойства самообновления стволовых клеток (Xie и Spradling, 2000; Mackenzie и Flake, 2001; Li и Neaves, 2006; Lilly et al., 2011).

Потенциал самообновления варьируется в зависимости от типа МСК. В питательной среде эмбриональные стволовые клетки способны самообновляться почти бесконечно, в то время как другие МСК самообновляются только в течение нескольких поколений. Механизм, лежащий в основе данного свойства, все еще неоднозначен. Одним из описанных механизмов является наличие и влияние теломеразы, фермента, необходимого для поддержания участков ДНК на концах хромосом путем предотвращения накопления повреждений ДНК из-за репликации (Greenwood и Lansdorp, 2003). Было замечено, что отсутствие теломеразы снижает способность гемопоэтических стволовых клеток, незрелых клеток костного мозга, (ГСК) к самообновлению (Allsopp et al., 2003a, b).

Способность к дифференциации разных типов стволовых клеток также варьируется. К примеру, эмбриональная стволовая клетка способна дать начало всем типам клеток трех зародышевых слоев, в то время как взрослые стволовые клетки обычно имеют ограниченный потенциал в данном аспекте. Недавние исследования показали расширение возможности дифференциации взрослых стволовых клеток. Дифференцировка МСК, ранее ограниченная остеогенными, хондрогенными и адипогенными линиями, как было изучено, распространяется и на другие линии, такие как миоцитокардиомиоцитоподобные клетки (Vieira et al., 2010; Wang et al., 2018), клетки нервной системы (Yan et al., 2015; Kriston-Pál et al., 2017; Li et al., 2017; Zhang et al., 2019), клетки, подобные зародышевым (Ghasemzadeh-Hasankolaie et al., 2014), и другие. Это явление известно как трансдифференциация. Таким

образом, дифференциация стволовых клеток изменчива в зависимости от воздействия и состава микросреды (Pelagalli et al., 2018).

МСК способны управлять работой иммунной системы и обеспечивать противовоспалительную активность (Kim et al., 2010; Carrade et al., 2012). Данные клетки не вызывают аллогенной реакции, поскольку они гипоиммуногенны и часто лишены главного комплекса гистосовместимости (МНС)-II. Они предотвращают выработку Т-клеток посредством изменения функционального состояния дендритных клеток и нарушения работы клеток-киллеров (Wang et al., 2009). МСК способны дополнительно модулировать функцию CD8⁺ (цитотоксических) и CD4⁺ (хелперы) Т-клеток, приводя к снижению их активности, пролиферации и дифференцировки. Клетки взаимодействуют с лимфоцитами CD4⁺ и CD8⁺ и при активации провоспалительных медиаторов производят факторы, которые приводят к снижению воспаления (Singer и Caplan, 2011). Подавление активации и пролиферации Т-клеток также может быть вызвано снижением появления специфических белков (маркеров активации) на поверхности лимфоцитов, таких как CD25, CD38 и CD69. Данное свойство МСК является иммуносупрессивным, используемым в регуляции воспаления (Bernier et al., 2013; Gugjoo et al., 2020).

Механизм миграции стволовых клеток и их фиксация в тканях - свойства, которые объясняют основу активности стволовых клеток в местах за пределами их среды имплантации или исходного местоположения (Mackenzie и Flake, 2001). Способность МСК мигрировать может быть обусловлена гуморальными факторами в дополнение к другим неизученным механизмам (Kode et al., 2009; Guest et al., 2010; McDuffee et al., 2012). Мобилизация МСК активируется путем снижения регуляции их адгезивных молекул посредством высвобождения цитокинов и/или хемокинов (Liu et al., 2009). Существуют различные факторы, способствующие перемещению МСК, такие как белок матричной металлопротеиназы (ММП)-9, хемокин (CXCL12) (подсемейство С-Х-С) и его рецептор CXCR4 (Hristov и Weber, 2009). Значительное

выделение инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) МСК может вызывать их депонирование через активацию SDF-1 α (Haider et al., 2008). В дополнение к SDF-1 α МСК могут внеклеточно высвобождать белок высокой подвижности (HMGB1) после их активации через воздействие воспалительных цитокинов или некроз клеток. Этот белок действует как хемоаттрактант для МСК (Palumbo и Bianchi, 2004; Chavakis et al., 2007). Активация фибробластов, вызванная травмой или ишемией, приводит к увеличению скорости миграции и инвазии МСК. В данном механизме участвуют два важных компонента, такие как основной фактор роста фибробластов (bFGF) и эпителиальный нейтрофил-активирующий пептид-78 (ENA-78 или CXCL5) (Nedeau et al., 2008).

Перемещение включает в себя миграцию МСК в кровеносные сосуды, адгезию эндотелиальных клеток на поверхности, трансэндотелиальную миграцию, экстравазацию и, в конечном итоге, их перемещение через тканевой матрикс к пораженной области (Zhuge et al., 2010). Стволовые клетки имеют многочисленные поверхностные рецепторы и выделяют молекулы клеточной адгезии, подобные лейкоцитам, которые способствуют миграции и фиксации клеток (Luster et al., 2005; Ley et al., 2007). Рецепторы включают интегрины, селектины, молекулы клеточной адгезии (CAM) и хемокиновые рецепторы. Считается, что Р-селектин, молекула клеточной адгезии, участвует в транспорте МСК, что замедляет их движение и позволяет им прилипать к эндотелию (Ruster et al., 2006). Другие различные молекулы адгезии, которые косвенно взаимодействуют с эндотелиальными клетками, включают интегрины, такие как $\alpha 1$ до $\alpha 5$ и $\beta 1$ до $\beta 4$, и CAM, такие как VCAM-1 до ICAM-3, ALCAM и CD105 (Krampera et al., 2006). Данные структуры адгезии экспрессируются на МСК и/или эндотелиальных клетках. CD44 считается ключевым фактором для миграции МСК из костного мозга, поскольку он перемещает их к кости через взаимодействие Е-селектина, поддерживаемого сосудистой сетью костного мозга (Sackstein et al., 2008). Роль гипоксии в возвращении стволовых клеток требует тщательного изучения, поскольку гипоксия активирует моноклеарные клетки периферической крови (Hopper

et al., 2015). Все эти исследования показывают, что активное воспаление является основным фактором, участвующим в управлении миграцией и возвращением МСК.

Клеточная терапия применяется в самых разных областях, и было признано, что ее терапевтический эффект зависит от факторов, выделяемых клетками. Помимо самих МСК в ветеринарии могут быть использованы их компоненты (Ratajezak et al., 2011). Лизат МСК содержит различные биологически активные молекулы, включая факторы роста, цитокины, хемокины и другие белки, которые обычно выделяются из клеток. Считается, что данные молекулы ответственны за терапевтический эффект МСК.

В последнее время бесклеточная терапия, такая как кондиционированная среда, оценивается как альтернатива МСК. В данной среде происходит накопление секрета МСК в процессе культивирования, богатого различными факторами роста, белками, цитокинами, хемокинами. Они участвуют в местных иммунных реакциях и определяют судьбу клеток-мишеней. Считается, что кондиционированная среда богата факторами роста, способствующими заживлению, такими как IGF-1, и факторами, которые ингибируют деградацию матрикса, такими как ингибиторы тканей MMP (Zhangfan et al., 2021).

Таким образом, мезенхимные стволовые клетки - мультипотентные стромальные клетки, способные дифференцироваться в различные типы клеток. Они могут быть выделены из различных тканей животных. МСК характеризуются высокой пролиферативной способностью, дифференцировкой, продуцируют широкий спектр биологически активных молекул, способны мигрировать в зону повреждения органов и тканей, оказывают иммуносупрессивное и регенеративное действие.

1.5 Методы выделения, накопления и криоконсервации мезенхимальных стволовых клеток

МСК возможно культивировать из костного мозга, жировой ткани, пуповины различными методами, включая классический метод и метод

градиента плотности. Используемые растворы градиента плотности - перколл (коллоидный раствор частиц кремния, плотность 1,084–1,088) и фиколл (раствор полисахарида; плотность 1,077) (Colleoni et al., 2009; Gugjoo et al., 2015; Потапнев, М. П., 2021; Долганова, О. М., 2021). После центрифугирования костного мозга надосадочная жидкость аспирируется, а полученный из него осадок промывается фосфатным буферным раствором (PBS) с последующим добавлением питательной среды в культуральную колбу. При использовании градиентного центрифугирования, фракцию МСК получают из костного мозга после добавления растворов градиента плотности и центрифугирования. Классический метод базируется на использовании свойства МСК - адгезии к пластику (пластиковые чашки для культивирования) без какого-либо разделения (Arnhold et al., 2007; Семченко, В. В. и др. 2024). Большинство исследований в настоящее время проводятся по протоколу центрифугирования в градиенте плотности (Bieback et al., 2008)

МСК из твердых тканей, например, жировой, обычно получают либо с помощью эксплантной культуры, либо с помощью протокола воздействия ферментами (Долганова, О. М., 2021). Метод эксплантной культуры является одним из самых ранних способов, в котором полноценно промытая и механически разделенная ткань (кусочки ткани размером менее нескольких миллиметров лучше пропускают газ и питательные вещества к клеткам) непосредственно помещается в культуральную колбу, содержащую питательную среду. Меньшая фракция МСК выходит из более мелких кусочков ткани и прилипает к поверхности чашки для культивирования. Остаточные кусочки смываются после видимого прикрепления клеток. В ферментативном протоколе выполняется дополнительный этап добавления ферментного раствора, такого как коллагеназа, для разрушения внеклеточного матрикса (ECM). Материал хранится в инкубаторе с шейкером для надлежащего расщепления (Квачева, З. Б., 2019). Полученная фракция SVF (стромально-васкулярная фракция) или MNC (фракция моноклеарных клеток), полученная после центрифугирования, переносится в чашки для

культивирования, содержащие питательную среду (Маклакова, И. Ю. и др., 2015; Гатиатулина, Е. Р. И др., 2019). Культуральные колбы или планшеты инкубируются при температуре 37 °C с 5 % углекислого газа и во влажных условиях. Клетки собирают после достижения 70–80 % покрытой клетками площади в колбах (Gugjoo et al., 2015; Сергеев, М. А. и др., 2021; Павлов, С. А. и Данилова, К. И., 2022).

Сравнение ферментативного метода с методом эксплантатов показало, что последний обеспечивает небольшую гетерогенную популяцию клеток, которая демонстрирует более высокие скорости пролиферации и лучшую жизнеспособность (Salehinejad et al., 2012; Hilkens et al., 2013; Yoon et al., 2013; Семченко, В. В. и др. 2024). Методы эксплантатов сохраняют кусочки ткани нетронутыми, а их внеклеточный матрикс не распадается, и, таким образом, клетки могут оставаться защищенными от протеолитического действия и механического стресса (Hendijani, 2017). Высвобождение цитокинов и факторов роста из ткани может дополнительно обеспечивать стимуляцию роста клеток (Jing et al., 2011; Shah et al., 2013). В ферментативных методах тип фермента и его концентрация играют важную роль в жизнеспособности клеток (Can и Karahuseyinoglu, 2007). Для увеличения количества и улучшения качества клеток можно использовать комбинацию ферментативного метода и механической диссоциации (Tong et al., 2011; Павлов, В. Н. и др., 2021).

Посев МСК осуществляется непосредственно в пластиковые чашки/колбы для культивирования, заполненные ростовой средой. Это связано с их характерным свойством пластиковой адгезии. МСК разрастаются и распространяются в ростовой среде в культуральных колбах. Ростковая среда включает субстрат или базальную среду, сыворотку плода крупного рогатого скота (FBS), антибиотики и/или антимикотики. Обычно, используемой базальной культуральной средой для культивирования МСК является модифицированная среда Игла Дульбекко (DMEM) или среда Альфа-MEM (Шаманская, Т. В. и др. 2010; Samprai et al., 2015). Также используются другие среды, такие как TCM199/DMEM (1:1) (Colleoni et al., 2005), среда Mesencult

(Hepsibha et al., 2011) и среда Aminomax-II (da Silva et al., 2016). Большинство клеток, которые не обладают свойствами пластической адгезии (включая гемопоэтические клетки), удаляются после переливания исходной культуральной среды. После достижения 70-80 % покрытия поверхности субстрата клетками, примерно через 10-14 дней клетки отделяют различными ферментами, такими как трипсин, трипсин-этилендиаминтетрауксусная кислота (трипсин-ЭДТА), коллагеназа I (Arnhold et al., 2007; Повещенко, О. В. и др., 2008, Li et al., 2015a) и пассажируются для дальнейшей пролиферации (Сабурина, И. Н. и др., 2015).

Фетальная бычья сыворотка (FBS) является одной из наиболее часто используемых дополнительных сред для культивирования МСК (Vidal et al., 2008; Toupadakis et al., 2010; Gugjoo et al., 2015). FBS применяется в концентрации от 5 % до 25 %. FBS содержит питательные вещества, гормоны или факторы роста, белки плазмы клеточной адгезии для клеточного роста и пролиферации (Повещенко, О. В. и др., 2008; Seo et al., 2013). FBS, соответствующая требованиям надлежащей производственной практики (GMP), доступна и используется для получения МСК клинического уровня (Li et al., 2015a). Среди различных альтернатив FBS существуют аутологичная сыворотка, аллогенная сыворотка, лизат тромбоцитов (Повещенко О. В. и др., 2008; Toupadakis et al., 2010; Schwarz et al., 2012; Bieback 2013) и коммерчески доступные заменители сыворотки (Schwarz et al., 2012). Данные альтернативные субстраты не способны обеспечить последовательную адгезию МСК, формирование корректной морфологии, паттерны роста (Schubert et al., 2018), скорость пролиферации (Schwarz с соавтор., 2012; Glynn et al., 2013) и иммуномодулирующие свойства (Шаманская, Т. В. и др. 2010; Russell et al., 2015; Clark с соавтор., 2016; Enciso et al., 2018).

В отсутствие сыворотки применение различных факторов роста или гуморальных факторов, таких как бычий фактор роста фибробластов (bFGF), эпидермальный фактор роста (EGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста фибробластов-2 (FGF-2), инсулиновый фактор роста -1 (IGF-1) и

наиболее существенно трансформирующий фактор роста- α (TGF- α), поддерживают пролиферацию МСК, особенно МСК баранов и быков (Mccarty с соавтор., 2009; Lu et al., 2014a, b). Совместное использование данных факторов роста также может влиять на пролиферацию, миграцию и инвазию МСК.

Классический метод культивирования МСК сложен, имеет низкую воспроизводимость, создает возможность контаминации и, прежде всего, менее экономичен для крупномасштабного расширения. Для минимизирования вероятности загрязнения и снижения стоимости, разработаны различные модификации протоколов. Альтернативой традиционной системы является биореактор с перемешиванием суспензии для расширения культуры МСК. Он может компенсировать ограничения, обычно связанные с традиционными методами. Так, популяция клеток может быть получена за более короткое время при меньших затратах (Roberts et al., 2019). Среди различных факторов выбор микроносителя имеет решающее значение (Радаева, И. Ф. и др., 2019). Микроноситель действует как поверхность для прикрепления и роста клеток. Коммерчески производимые микроносители для культивирования МСК бывают пористыми или непористыми из различных материалов (Petru et al., 2016; Rafiq et al., 2016). Такие характеристики микроносителей, как состав, пористость, топография и поверхностный заряд, определяют качество прикрепления клеток (Martin et al., 2011).

МСК могут быть использованы в качестве аллогенной терапии и, как таковые, могут храниться для будущего использования и транспортировки. Клетки могут быть пересажены со вспомогательной средой, например, с фосфатно-солевым буфером (PBS), в то время как другие вспомогательные среды, например, аспират костного мозга, плазма, сыворотка и криогенная среда, должны быть удалены до имплантации клеток *in vivo*. При более коротком сроке хранения (9-12 ч) вспомогательные биологические среды не имеют видимых преимуществ в процессе поддержания жизнеспособности МСК по сравнению со вспомогательным веществом (Bronzini et al., 2012).

Было показано, что вспомогательные биологические среды сохраняют жизнеспособность клеток в течение 24 ч, и к 72 ч этот показатель снижается до 25 % - 78 %. Криогенная среда поддерживает жизнеспособность клеток лучше, чем биологические жидкости. Криогенное хранение МСК в различных средах, таких как сыворотка, диметилсульфоксид (ДМСО) и FBS, обеспечивало удовлетворительную жизнеспособность клеток после размораживания (80–90 %) (Mitchell et al., 2015; Garvican et al., 2016).

Криоконсервация клеток достигается быстрой или медленной скоростью замораживания. Во время данного процесса проводятся различные этапы для избежания дегидратации и повреждения клеток. Во время быстрой скорости замораживания дисбаланс растворенных веществ и электролитов может нанести ущерб, вместе с тем во время медленного процесса замораживания внутри- и внеклеточное образование кристаллов льда может оказать неблагоприятное воздействие на жизнеспособность клеток. Для предотвращения повреждения во время процесса добавляется криопротектор для снижения общей температуры замерзания (Пинчук, С. В. и др., 2017). Объединенная смесь клеток, среды и криопротектора, создает систему, которая имеет более низкую температуру замерзания по сравнению с отдельными компонентами. Важно отметить, что метод замораживания-оттаивания напрямую влияет на жизнеспособность клеток. В одном из исследований сообщалось о высокой гибели клеток после оттаивания, что могло быть связано с неправильным процессом оттаивания (Espina et al., 2016). Другой способ криоконсервации, включающий чрезвычайно быстрый (>-1000 °C/c) процесс охлаждения, известный как витрификация, также использовался для сохранения клеток (Fowler и Toner, 2005). В этом процессе клетки и криопротектор погружаются в открытые сосуды для хранения. Однако необходимость более высокой концентрации криопротектора, непрерывное поддержание клеток в криогенной температуре и потребность открытых контейнеров делает витрификацию наименее предпочтительным методом для криоконсервации МСК (Fowler и Toner, 2005).

Криоконсервация необходима, поскольку МСК, в отличие от эмбриональных стволовых клеток, не могут культивироваться бесконечно, так как они подвергаются старению после определенных пассажей культуры. Замораживание способствует сохранению жизнеспособности в течение долгого времени (Пинчук, С. В. и др., 2017).

При температуре ниже -120°C большинство метаболических процессов находится в состоянии стазиса, и, таким образом, клетки могут сохраняться долго (Ji et al., 2016; Tian et al., 2016). МСК достаточно ограничены в количестве в естественных источниках, и, таким образом, расширение *in vitro* остается необходимым процессом (Gugjoo et al., 2016). Концентрация и характеристики МСК различаются в зависимости от источника и зависят от питания, возраста и состояния здоровья донора (Han et al., 2010).

Криоконсервация МСК выполняется в криогенных средах, содержащих криопротектор, который предотвращает повреждение клеток во время замораживания и оттаивания (Thirumala et al., 2010). Концентрация криопротектора различается в зависимости от вида и источника, а также от используемой техники замораживания (Fuller, 2004; Thirumala et al., 2005). Криопротекторы бывают двух типов - проницаемые и непроницаемые для клеточной мембраны (Fuller, 2004), при этом высокопроницаемые криопротекторы, как правило, более токсичны (Gao и Critser, 2000). Для предотвращения токсичности, проницаемые криопротекторы, такие как диметилсульфоксид (ДМСО), этиленгликоль и т. д., комбинируют с менее проницаемыми, такими как гидроксиэтилкрахмал (ГЭК), декстран и полиэтиленгликоль (Gao и Critser, 2000; Fuller, 2004; Климович, П. С. и др., 2018). В ветеринарной практике чаще всего используются криопротекторы, такие как ДМСО и FBS (Martinello et al., 2010; Marx et al., 2015). Ксеногенные белки в FBS могут изменять поведение клеток (Duan и Lopez, 2016) и должны быть удалены перед имплантацией.

ДМСО - один из наиболее часто используемых криопротекторов в ветеринарной практике, который работает путем стабилизации клеточных

белков и уравнивания электролитов. Гидрофобные взаимодействия между ДМСО и белками и/или фосфолипидами клеточной мембраны стабилизируют клеточные белки. Уравнивание электролитов происходит путем вытеснения внутриклеточных жидкостей (Liu et al., 2010; Гулевский, А. К. и др., 2014). Кроме того, ДМСО образует высокоэнергетические связи с молекулами воды, которые предотвращают образование кристаллов льда. Несмотря на такие особенности, ДМСО может привести к потенциальному химическому и осмотическому шоку (Scheinkonig et al., 2004; Liu et al., 2010; Климович, П. С. и др., 2018). ДМСО может быть связан с побочными эффектами, такими как нейротоксичность, и может привести к гипотонии и анафилактическому шоку при внутривенной инъекции вместе с клетками (Junior et al., 2008). Такие побочные эффекты можно устранить путем промывания клеток, хотя это может привести к снижению потенциала колониеобразующих единиц (КОЕ) (Fry et al., 2015). Кроме того, полное удаление ДМСО является сложным и трудоемким процессом, требующим альтернатив (Thirumala et al., 2009; Климович, П. С. и др., 2018).

Фетальная бычья сыворотка (FBS) действует и как криопротектор. Она защищает клеточные белки и стабилизирует осмотическое давление. Жизнеспособность МСК после размораживания может повышаться с увеличением концентрации FBS. Данная среда может представлять ксеногенные и/или зоонозные угрозы, в дополнение к этическим проблемам (Liu et al., 2010; Verdanova et al., 2014). Учитывая данную информацию, изучаются альтернативы использования FBS.

На основе вышеизложенного, МСК могут быть выделены из таких органов и тканей, как костный мозг, жировая ткань, печень или пуповина, накапливаются путем расширения культуры и криоконсервируются в криогенных средах, содержащих протектор, который предотвращает повреждение клеток во время замораживания и оттаивания с помощью таких методов, как медленное замораживание или витрификация.

1.6 Заключение по обзору литературы

Криоконсервация спермы является сложной техникой, требующей надлежащего баланса многих факторов для достижения оптимальных результатов. Сперматозоиды баранов-производителей содержат низкое внутримембранное соотношение холестерина к фосфолипидам и другие видовые особенности, такие как высокая метаболическая активность митохондрий, влияние сезонности на морфологию, быстрая акросомальная реакция. Следовательно, чувствительность к холодовому шоку у половых клеток баранов выше, чем у других видов животных. Разбавители, методы разбавления, охлаждения, замораживания и размораживания играют роль в успешности криоконсервации спермы баранов. Совершенствование методов криоконсервации имеет решающее значение не только для улучшения животноводства и здоровья животных, но и для сохранения исчезающих видов животных и обеспечения глобальной продовольственной безопасности. Многие работы направлены на разработку новых протоколов, методов оценки и создании разбавителей для сохранности жизнеспособности семени после оттаивания, тем самым увеличения вероятности успешного оплодотворения. В этой связи особый интерес вызывают МСК. Благодаря выделяемым факторам роста, белкам, цитокинам и хемокинам МСК способны к иммуномодуляции и обеспечению противовоспалительной активности, что может способствовать регенеративному эффекту при криоконсервации сперматозоидов. Они могут быть выделены из множества органов и тканей, несложно накапливаются путем расширения культуры и консервируются в криогенных средах. Было проведено несколько исследований на тему влияния МСК на сперматозоиды разных видов животных и установлены положительные эффекты, что делает их компонентом выбора для улучшения морфологии и переживаемости сперматозоидов баранов-производителей в процессе криоконсервации.

Глава 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследования

Работа выполнена в период с 2023-2026 гг. в научно-образовательной лаборатории по трансплантации эмбрионов животных на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины».

Объектом исследований служили половозрелые бараны романовской породы в возрасте 1,5-2,5 лет. Предметом исследований являлись сперматозоиды баранов-производителей, а также МСК и их производные.

Работа состояла из четырех этапов.

На первом этапе работы был подобран корректный протокол криоконсервации семени баранов-производителей. Взятие спермы ($n=10$) осуществлялось с помощью искусственной вагины согласно ГОСТ 32222–2013. Протокол предподготовки эякулята к процессу криоконсервации включал в себя центрифугирование (режим: 700 об/мин в течение 15 минут), и последующее удаление семенной плазмы. Для разбавления спермы был использован разбавитель OptiXcell (IMV, Франция). Образцы разбавляли в соотношении 1:4, далее - охлаждали при температуре $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1,5 часов. После чего производили ручную упаковку разбавленной спермы при помощи пайет объемом 0,25 мл при температуре $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Протокол заморозки образцов спермы состоял из двух этапов: 1 шаг – соломинки помещали в гоблеты и далее - стаканы 4 см над жидким азотом на 10 минут ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$); 2 шаг – полное погружение в жидкий азот для дальнейшего хранения. Оттаивание спермы производилось при температуре $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 сек. Оценку качественных показателей спермы производили в пять этапов: после взятия спермы, 1,5 часа после охлаждения, после оттаивания: 0, 1 и 2 часа.

На втором этапе было определен протокол выраженного регенеративного действия МСК из жировой ткани (ЖТ) и костного мозга (КМ) баранов на морфофункциональные показатели сперматозоидов. Данный этап разделили на два подэтапа. На первом этапе МСК КМ в количестве 2×10^6 кл/мл

смешивали со спермой в концентрации $<7 \times 10^8$ кл/мл ($453 - 523 \times 10^8$ кл/мл). Сформировали две группы проб ($n=7$ в каждой): контрольная (сперматозоиды $<7 \times 10^8$ кл/мл + стерильный буфер PBS) и опытная (сперматозоиды $<7 \times 10^8$ кл/мл + 2×10^6 кл/мл МСК КМ). На втором – было сформировано три группы проб ($n=7$ в каждой): контрольная (сперматозоиды $7 \times 7 \times 10^8$ кл/мл+буфер PBS), первая опытная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл+МСК КМ 2×10^6 кл/мл) и вторая опытная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл+МСК ЖТ 2×10^6 кл/мл). Качество спермы определяли через 0, 1 и 2 часа после взятия. При этом сперматозоиды инкубировали с МСК в термостате при $+37$ °С. Дополнительно изучали влияние производных стволовых клеток (лизат и кондиционированная среда) на качественные показатели спермы производителей. Было сформировано пять групп проб по 10 в каждой: контрольная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл + буфер PBS 100 мкл, pH – 7,4), первая опытная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл + КР МСК КМ 100 мкл, pH – 7,2), вторая опытная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл + КР МСК ЖТ 100 мкл, pH – 7,2), третья опытная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл + КС МСК КМ 100 мкл, pH – 7,2), четвертая опытная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл + КС МСК ЖТ 100 мкл, pH – 7,2). С целью установления степени переживаемости сперматозоидов в средах, содержащих МСК, и определения их влияния на качественные показатели сперматозоидов, была проведена четырехэтапная оценка качества спермы: 0, 1, 2 и 3 часа после инкубации спермы с производными МСК при температуре $+ 38$ °С. Сравнение значений производилось на каждом этапе инкубации (0, 1, 2 и 3 часа) внутри каждой группы. При этом достоверными считались различия при $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,05$.

На третьем этапе проводили криоконсервацию с добавлением МСК КМ и ЖТ в качестве компонента разбавителя. После взятия спермы, ее оценки и удаления семенной плазмы было сформировано три группы ($n=10$ в каждой): контрольная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл + разбавитель OptiXcell (IMV, Франция), общий объем 100 мкл, pH – 6,55), первая опытная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл + разбавитель OptiXcell (IMV, Франция)+МСК КМ 2×10^6 кл/мл, pH – 6,14), вторая опытная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл + разбавитель OptiXcell

(IMV, Франция) + МСК ЖТ 2×10^6 кл/мл, рН – 6,35). После проведенного разбавления, сформировавшие образцы охлаждали, упаковывали (соломинки) и замораживали. Оценку качества спермы проводили в пять этапов: разбавление, охлаждение, оттаивание (инкубация спермы при температуре + 38 °C): 0, 2 и 4 часов (схема 1).

На четвертом этапе осуществляли добавление МСК КМ и ЖТ непосредственно после криоконсервации. После замораживания-оттаивания спермы было сформировано три группы (n=10 в каждой): контрольная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл + разбавитель OptiXcell (IMV, Франция), общий объем 100 мкл, рН – 5,55), первая опытная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл + разбавитель OptiXcell (IMV, Франция)+МСК КМ 2×10^8 кл/мл, рН – 5,14), вторая опытная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл + разбавитель OptiXcell (IMV, Франция) + МСК ЖТ 2×10^6 кл/мл, рН – 5,35). С целью установления степени переживаемости сперматозоидов после оттаивания была проведена шестичасовая инкубация спермы в средах, содержащих OptiXcell и МСК при температуре + 38 °C с оценкой качественных показателей каждые два часа после оттаивания (0, 2, 4, 6 часов). Исследование спермы проводилось с помощью микроскопа Levenhuk MED 45T. Для подсчета концентрации сперматозоидов использовалась камера Горяева.

Оценка подвижности сперматозоидов проводилась с использованием программы Аргус-CASA и камеры Маклера (увеличение 10X10). При этом полученные образцы были разведены в соотношении 1:100. При оценке подвижности учитывалось количество прогрессивнодвигающихся, непрогрессивнодвигающихся и неподвижных сперматозоидов, а также скорость криволинейного движения сперматозоидов. При оценке подвижности учитывались следующие параметры: VAP - средняя скорость движения головки по усредненной траектории, мкм/сек; VSL - скорость прямолинейного движения головки, мкм/сек; VCL - средняя скорость движения сперматозоидов по реальной траектории, мкм/сек; ALH – среднее отклонение головки, мкм; BCF - частота колебательных усредненных движений, Гц; STR - степень

прямолинейности направленного движения сперматозоидов; LIN - степень волнистости треков; WOB - процент осцилляции.

Оценка морфологии сперматозоидов проводилась ручным способом (200 сперматозоидов в каждом образце), при этом для окрашивания мазков был использован набор Sperm Blue (Microptic) с предварительной фиксацией мазков (фиксатор: 10 минут, краситель: 18 минут) и последующей микроскопией (увеличение с использованием объектива 100x10, иммерсионное масло). При оценке морфологии учитывалось количество нормальных сперматозоидов, а также количество сперматозоидов с дефектами головки, шейки и хвостовой части. Оценка жизнеспособности проводилась по методике BrightVit (Microptic). При этом были исследованы 200 сперматозоидов в каждом образце (мертвые клетки были окрашены в розовый цвет, живые – в белый). Нигрозин служил фоновым пятном для обеспечения контраста. Оценку целостности акросомы проводили согласно методике FluoAcro (Microptic) (100 сперматозоидов в каждом образце). При этом интактная акросома была окрашена в ярко-зеленый цвет, повреждение целостности акросомы регистрировали при наличии зеленой полосы на экваториальном сегменте (реагирующая), синяя окраска означала повреждение акросомы.

Жировую ткань (ЖТ) и костный мозг (КМ) получали после убоя баранов породы Дорпер (n=3) в крестьянско-фермерском хозяйстве Волховского района Ленинградской области. Отобранную ЖТ (2 см³) помещали в стерильную пробирку с 10 мл транспортировочной среды (буферный раствор, содержащий 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, Gibco, США). КМ (3 см³) брали из бедренной кости иглой для аспирации костного мозга и переносили в стерильную пробирку с гепарином. Пробирки с биоматериалом доставляли в лабораторию при 4 – 8 °С в течение 3 часов. В лаборатории биотехнологии научного центра ООО «ЦитоГенТест» пробы обрабатывали. Жировую ткань в условиях ламинарного бокса промывали буфером PBS, измельчали при помощи микроножниц и инкубировали 45 мин

при 37 °С в растворе коллагеназы (0,075 %, тип 2) (ПанЭко, Россия) при постоянном помешивании. Полученную суспензию фильтровали, центрифугировали, полученный осадок разводили средой α MEM + 10 % FBS и высевали в культуральные флаконы площадью 25 см². Через 24 ч среду заменяли и удаляли неприкрепленные клетки. Монослой МСК ЖТ формировался к 10 суткам после выделения.

КМ разбавляли 1:1 стерильным раствором PBS, центрифугировали, полученный осадок еще два раза промывали описанным способом. Затем к осадку добавляли среду α MEM + 10 % FBS и высевали в культуральные флаконы площадью 25 см². Через 24 часа среду заменяли и удаляли неприкрепленные клетки. Спустя 48 часов процедуру повторили. Монослой МСК КМ формировался к 10 суткам после выделения. На втором пассаже клетки криоконсервировали и депонировали в Криобанке. Начиная с 3-го пассажа после размораживания, их использовали в работе.

Кондиционированную среду (КС) отбирали через 72 ч культивирования в матрасах с 90-100 % монослоем клеток. Для приготовления лизата (КР) МСК отделяли от подложки, отмывали от ростовой среды и суспендировали в PBS с концентрацией 2×10^8 кл/мл. Затем суспензию аликвотировали и фасовали в пробирки Эппендорфа. Лизат получали методом криодеструкции путем двукратного быстрого погружения в жидкий азот (-196 °С) и медленного оттаивания при комнатной температуре. Полученный таким образом лизат содержал высвобожденные внутриклеточные белково-пептидные компоненты МСК и фрагменты клеточных мембран.

Статистическая обработка данных была проведена при помощи программы Stattech и Medstatistic «Медицинская Статистика» с вычислением показателей вариационного ряда и t-критерий Стьюдента.

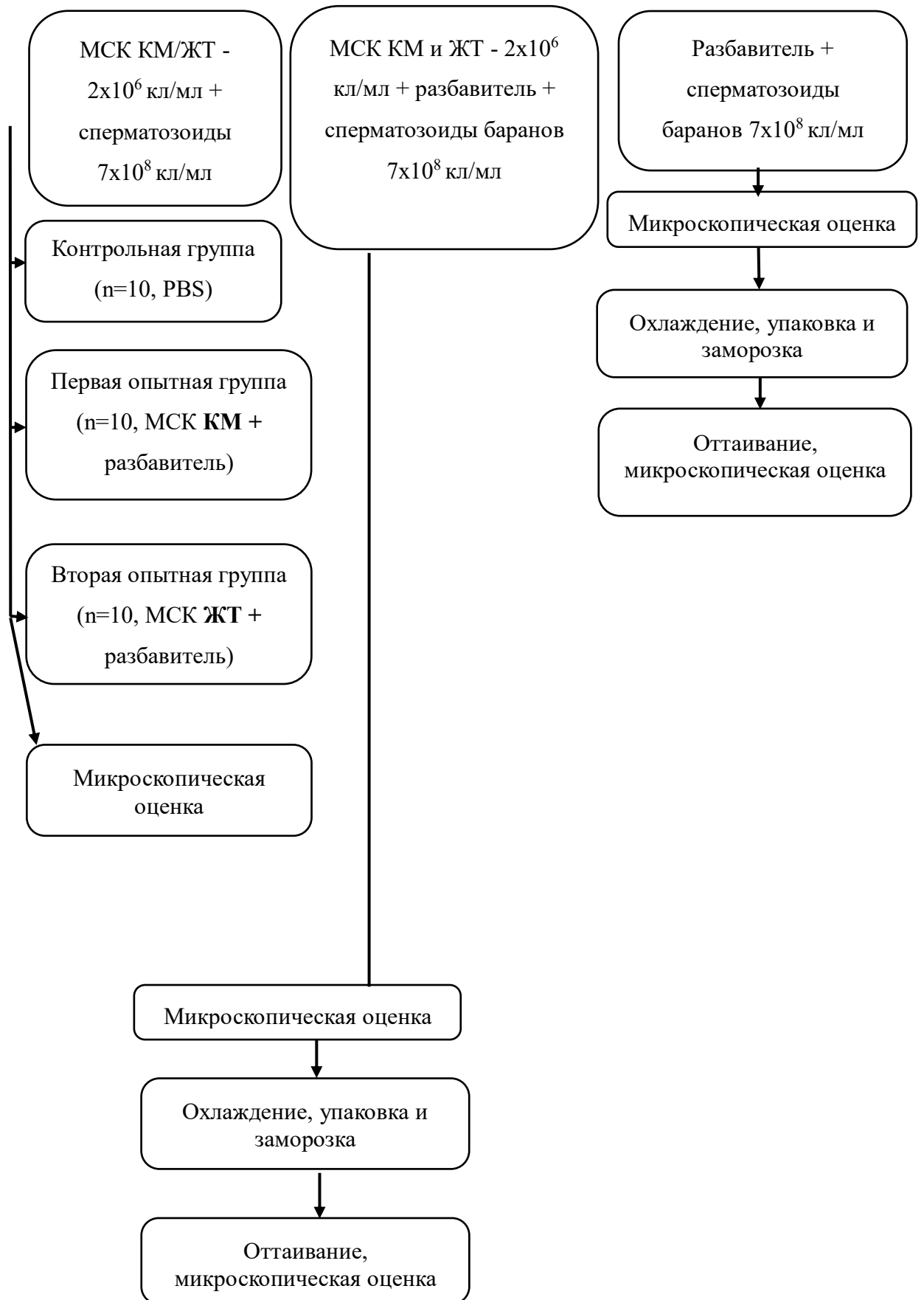


Рисунок 1 – Схема проведения эксперимента.

2.2 Собственные исследования

2.2.1 Результаты апробации протокола заморозки спермы баранов

В результате первого этапа работы был подобран протокол криоконсервации спермы баранов-производителей. При проведении макроскопической оценки качества спермы после взятия, сперма баранов была белого цвета с желтоватым оттенком, имела запах жирапота, объем в среднем составлял $0,50 \pm 0,03$ мл, концентрация – $3,46 \pm 0,26$ млрд, интенсивность окислительно-восстановительных процессов составляла $3,3 \pm 0,6$ мин.

Результаты морфологической оценки сперматозоидов баранов до и после разбавления с последующим замораживанием приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Морфологическая оценка сперматозоидов баранов до и после криоконсервации ($M \pm m$, $n=10$)

Время проведения	Норма, %	Патологические формы, %			
		Головка	Шейка	Хвост	Другие
0 часов после взятия	$55,9 \pm 5,2$	$7,2 \pm 2,4$	$11,3 \pm 2,3$	$24,9 \pm 4,0$	$1,0 \pm 0,5$
1,5 часа после охлаждения	$48,3 \pm 3,6$	$4,6 \pm 0,9$	$15,1 \pm 2,7$	$29,5 \pm 1,5$	$2,7 \pm 0,7$
0 часов после оттаивания	$47,5 \pm 3,9$	$7,0 \pm 1,4$	$14,9 \pm 3,1$	$28,7 \pm 2,7$	$2,6 \pm 0,4$
1 час после оттаивания	$40,5 \pm 4,4$ **	$8,9 \pm 1,1$	$15,9 \pm 2,5$	$32,2 \pm 5,3$	$2,6 \pm 0,8$ **
2 часа после оттаивания	$38,2 \pm 3,6$ *	$8,3 \pm 1,1$	$17,6 \pm 3,3$	$32,9 \pm 4,1$	$3,1 \pm 0,7$ **

Примечание: * - $p \leq 0,01$, ** - $p \leq 0,05$. Уровень достоверности по сравнению с результатами 0 часов после взятия спермы.

Согласно данным таблицы 1, тенденция к сокращению количества нормальных сперматозоидов наблюдалась при глубоком замораживании и оттаивании спермы. При этом статистически значимая разница наблюдалась между данным показателем 0 часов после взятия спермы и 1, 2 часа после оттаивания – 1,3 ($p \leq 0,05$) и 1,4 ($p \leq 0,01$) раза соответственно. Нужно отметить, что наиболее выраженные изменения в морфологической структуре сперматозоидов отмечались после оттаивания спермы (деформация шейки и

хвоста). Также было зарегистрировано увеличение количества патологической формы головки сперматозоидов в 2,6 и 3,1 раза ($p \leq 0,05$) после оттаивания (1 и 2 часа) по сравнению с показателем после взятия.

В ходе проведенных исследований было выявлено положительное воздействие разбавителя OptiXcell (IMV, Франция) на жизнеспособность сперматозоидов (рисунок 1). Так, процент прогрессивно двигающихся сперматозоидов при разбавлении спермы в соотношении 1:4 с последующим ее охлаждением в течение полутора часов незначительно снизился на 3,8 % по сравнению с данными 0 часов после взятия. Статистически значимая разница значений прогрессивности движений сперматозоидов с тенденцией к их снижению наблюдалась после оттаивания: на 22,6 % - 0 часов ($p \leq 0,01$), на 24,8 % - 1 час ($p \leq 0,05$), на 33,7 % - 2 часа ($p \leq 0,01$).

Наибольшее количество непрогрессивно двигающихся сперматозоидов было зарегистрировано после взятия спермы с дальнейшим их сокращением на 11 % ($p \leq 0,01$) после охлаждения, на 15 % ($p \leq 0,05$) - 0 часов после оттаивания ($p \leq 0,05$), на 15,7 % - 1 час после оттаивания ($p \leq 0,05$), на 17,5 % - 2 часа после оттаивания ($p \leq 0,05$).

Согласно данным рисунка 1, наибольшее количество неподвижных сперматозоидов было выявлено через 2 часа после оттаивания. При этом процент неподвижных сперматозоидов был равен $61,0 \pm 10,1$ с статистически значимой разницей значений, равной 51 % ($p < 0,01$) по сравнению с результатами оценки подвижности сперматозоидов 0 часов после взятия. Полученные данные указывают на отрицательные действие перепада температурных значений на активность сперматозоидов. Подробный анализ показателей подвижности сперматозоидов баранов до и после криоконсервации приведены в таблице 2.

Было установлено достоверное снижение скорости прямолинейного движения головки сперматозоидов полтора часа после охлаждения и 0 часов после оттаивания в 2,2 ($p < 0,05$) и 2,9 ($p < 0,01$) раза соответственно по сравнению со значением после взятия спермы.

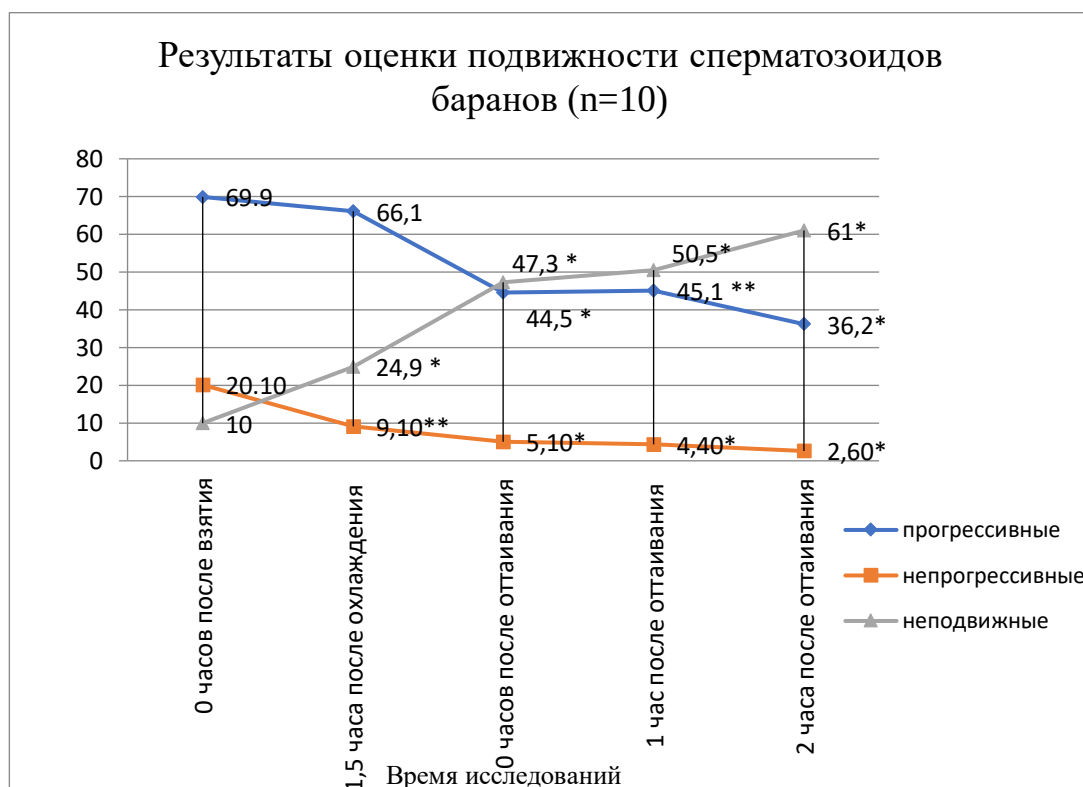


Рисунок 1 – Результаты оценки подвижности сперматозоидов баранов (n=10).

*Примечание: * - $p < 0,01$, ** - $p < 0,05$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов после взятия спермы).*

Данная тенденция наблюдалась также при анализе средней скорости движения сперматозоидов по реальной траектории и средней скорости движения головки по усредненной траектории. При этом разница значений 0 часов после взятия спермы и ее оттаивания была статистически достоверной для обоих показателей и составила 2,9 раза ($p < 0,01$).

Прослеживалась тенденция к увеличению скорости прямолинейного движения головки сперматозоидов, средней скорости движения головки по усредненной траектории, средней скорости движения сперматозоидов по реальной траектории, а также среднего отклонения головки 1 и 2 часа после оттаивания по сравнению со значениями, зарегистрированными 0 часов после оттаивания. Однако разница значений не была статистически значимой.

Таблица 2 – Показатели подвижности сперматозоидов баранов до и после криоконсервации ($M \pm m$, $n=10$).

Время проведения	Показатели подвижности							
	VSL, мкм/сек	VCL, мкм/сек	LIN, %	VAP, мкм/сек	WOB, %	STR, %	ALH, мкм	BCF, Гц
0 часов после взятия	606,63 ± 132,07	738,04 ± 138,11	74,91± 7,13	630,14 ± 135,15	78,61± 6,61	94,15± 1,81	2,56± 0,31	2206,61± 489,37
1,5 часа после охлаждения	276,08 ± 54,01* *	405,12 ± 68,71	68,51± 6,57	307,71 ± 55,63 **	77,31± 4,75	87,14± 4,12	2,15± 0,32	2291,34± 717,55
0 часов после оттаивания	202,07 ± 34,09*	256,41 ± 38,82*	71,54± 7,43	220,11 ± 35,41*	76,95± 5,61	91,15± 4,54	1,98± 0,56	1353,68± 468,26
1 час после оттаивания	302,05 ± 120,61	402,51 ± 132,83	67,22± 7,41	320,43 ± 125,71	72,12± 6,81	92,42± 2,46	2,15± 0,41	1234,71± 494,25
2 часа после оттаивания	300,44 ± 110,82	425,05 ± 124,08	61,15± 7,16	315,84 ± 113,42	66,41± 6,15	89,24± 6,21	2,15± 0,41	1806,15± 500,12

Примечание: * - $p < 0,01$, ** - $p < 0,05$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов после взятия спермы).

Таким образом, выбранный протокол криоконсервации обеспечил прогрессивность движений сперматозоидов с тенденцией к их снижению после оттаивания: на 22,6 % - 0 часов после оттаивания ($p \leq 0,01$), на 24,8 % - 1 час после оттаивания ($p \leq 0,05$), на 33,7 % - 2 часа после оттаивания ($p \leq 0,01$), что является результатом с положительной динамикой, учитывая высокую чувствительность и низкую жизнеспособность клеток в процессе заморозки-разморозки (Пушкина, В. С. с соавтор. 2023.).

2.2.2 Влияние МСК и их производных на качество нативной спермы баранов

После взятия материала была проведена органолептическая оценка в ходе которой определено, что сперма баранов была белого цвета с

желтоватым оттенком, имела запах жиропота, объем в среднем составлял $0,6 \pm 0,02$ мл, концентрация сперматозоидов – $5,23 \pm 1,84$ млрд, интенсивность окислительно-восстановительных процессов равнялась $2,6 \pm 0,4$ мин.

Во втором опыте, отраженном в разделе «Материалы и методы», целью которого явилось разработка протокола использования МСК ЖТ и МСК КМ баранов и сперматозоидов, установили выраженное положительное влияние МСК КМ на двигательную активность сперматозоидов. Доля прогрессивно двигающихся клеток увеличилась в течение 1 часа после взятия материала в 1,1 раза по сравнению с контролем (рисунок 2). Но через 2 часа неподвижных сперматозоидов стало достоверно больше ($p < 0,01$) по сравнению с показателями свежеполученного эякулята.

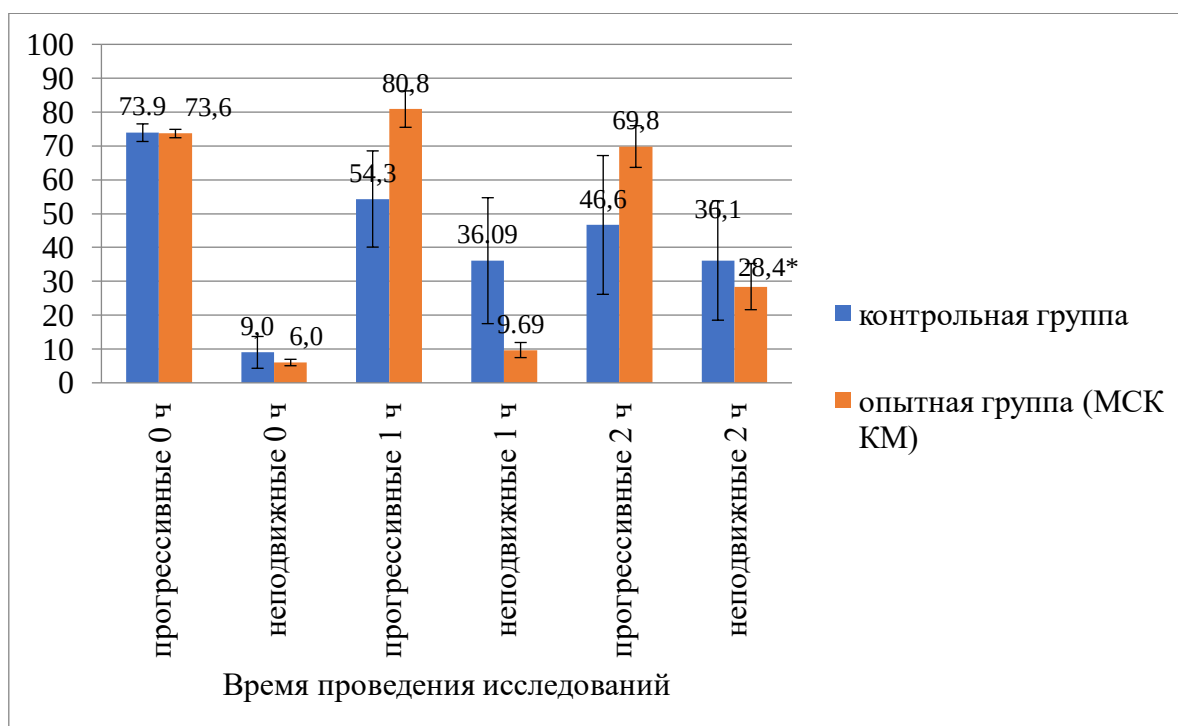


Рисунок 2 – Подвижность сперматозоидов баранов.

*Примечание: * $p < 0,01$, по сравнению с 0 часов после взятия спермы.*

В контрольной группе отмечали снижение количества прогрессивно двигающихся клеток. Через 1 и 2 часа после получения образца их стало меньше в 1,3 и 1,6 раза соответственно, а неподвижных сперматозоидов – больше в 4 раза.

Морфология клеток при использовании первого протокола (2×10^6 кл/мл МСК и $< 7 \times 10^8$ кл/мл сперматозоидов) показана на рисунке 3. Зафиксировано, что в течение двух часов после получения спермы доля нормальных гамет уменьшалась в обеих группах, наибольшие изменения были в хвостовой части. В опытной группе число сперматозоидов с повреждением хвоста возросло в 1,3 раза, в контрольной – в 1,1 раза по сравнению с исходными данными. Полученные различия статистически недостоверны, но тенденцию следует отметить.

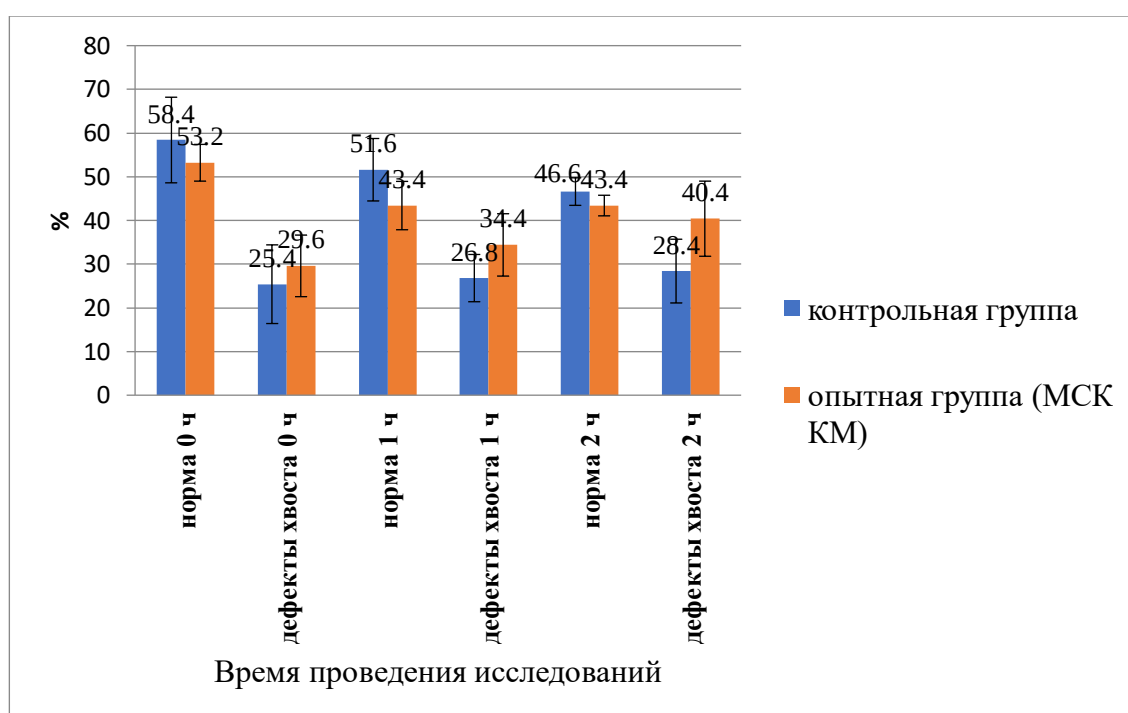


Рисунок 3 – Морфология сперматозоидов баранов при инкубации с МСК КМ.

Установлено, что снижение количества морфологически нормальных гамет в контрольной группе закономерно для жизнеспособности мужских половых клеток вне организма, а протокол использования МСК в количестве 2×10^6 кл/мл и сперматозоидов в концентрации $< 7 \times 10^8$ кл/мл необходимо дорабатывать в дальнейших исследованиях. Это подтверждает замеченная кратковременная активизация половых клеток при смешивании их с МСК, из костного мозга.

Далее определяли влияние МСК из жировой ткани и костного мозга на качество спермы баранов. Установили закономерное снижение двигательной активности клеток в образцах контрольной группы, достоверные ($p<0,01$) различия (2,8 раза) регистрировали через 2 часа после получения спермы (рисунок 4).

МСК из ЖТ при добавлении в эякулят барана-производителя оказали пролонгированное положительное влияние на двигательную активность сперматозоидов. Увеличение в 1,1 раза числа прогрессивно двигающихся клеток отмечали через 1 и 2 часа после получения образцов. МСК из костного мозга в количестве 2×10^6 кл/мл сохраняли двигательную активность в течение первого часа после получения спермы. Через 2 часа процент прогрессивно двигающихся сперматозоидов уменьшился в 1,16 раза ($p<0,01$). В это же время в 4 раза увеличилось количество неподвижных клеток.

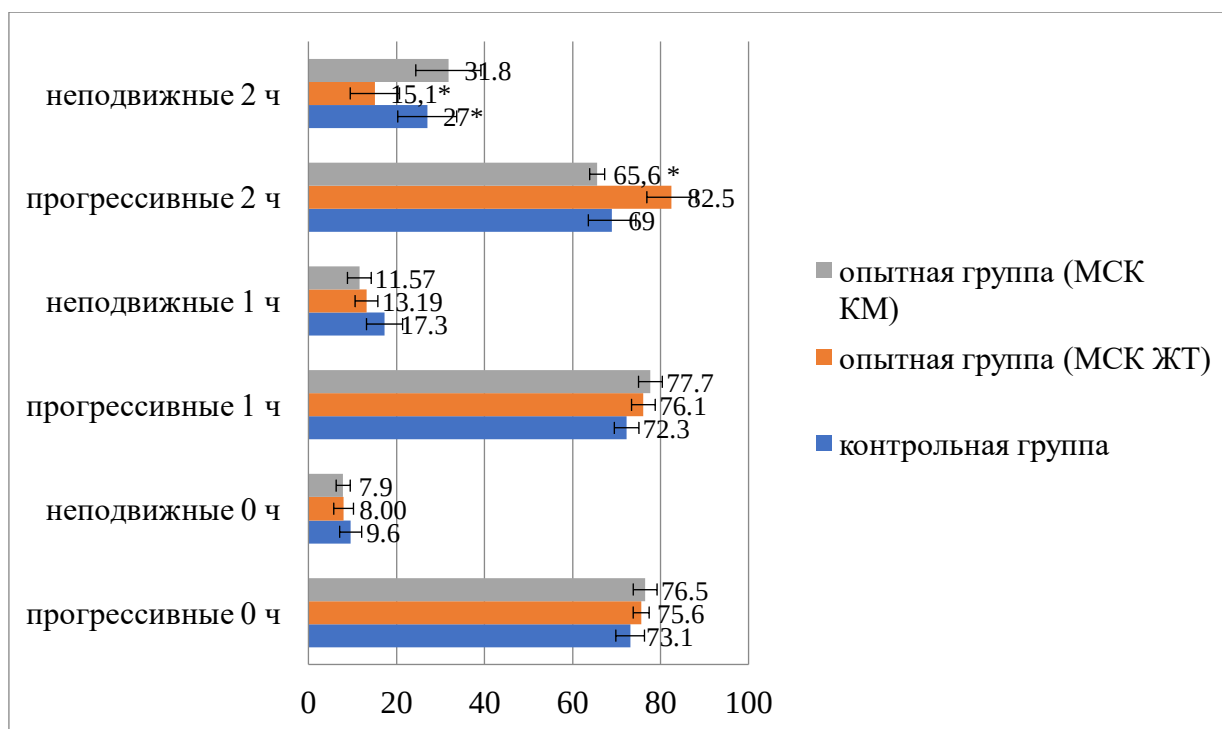


Рисунок 4 – Подвижность сперматозоидов баранов при инкубации с МСК КМ и МСК ЖТ.

*Примечание: * $p<0,01$, по сравнению с 0 часов после взятия спермы.*

Регенеративная способность МСК была установлена в протоколе, включающем использование МСК ЖК или МСК КМ в количестве 2×10^6 кл/мл и сперматозоидов барана в концентрации 7×10^8 кл/мл.

В контрольной группе в течение двух часов после получения спермы количество нормальных сперматозоидов уменьшалось, а число клеток с дефектами хвоста увеличивалось (рисунок 5). В то же время, в опытных группах наблюдали сохранение и увеличение доли морфологически нормальных гамет, снижение (в 1,7 раза) случаев повреждения хвостовой части (преимущественно во второй опытной группе с МСК ЖТ). Но и в первой опытной отмечали тенденцию к сохранению целостности и подвижности половых клеток.

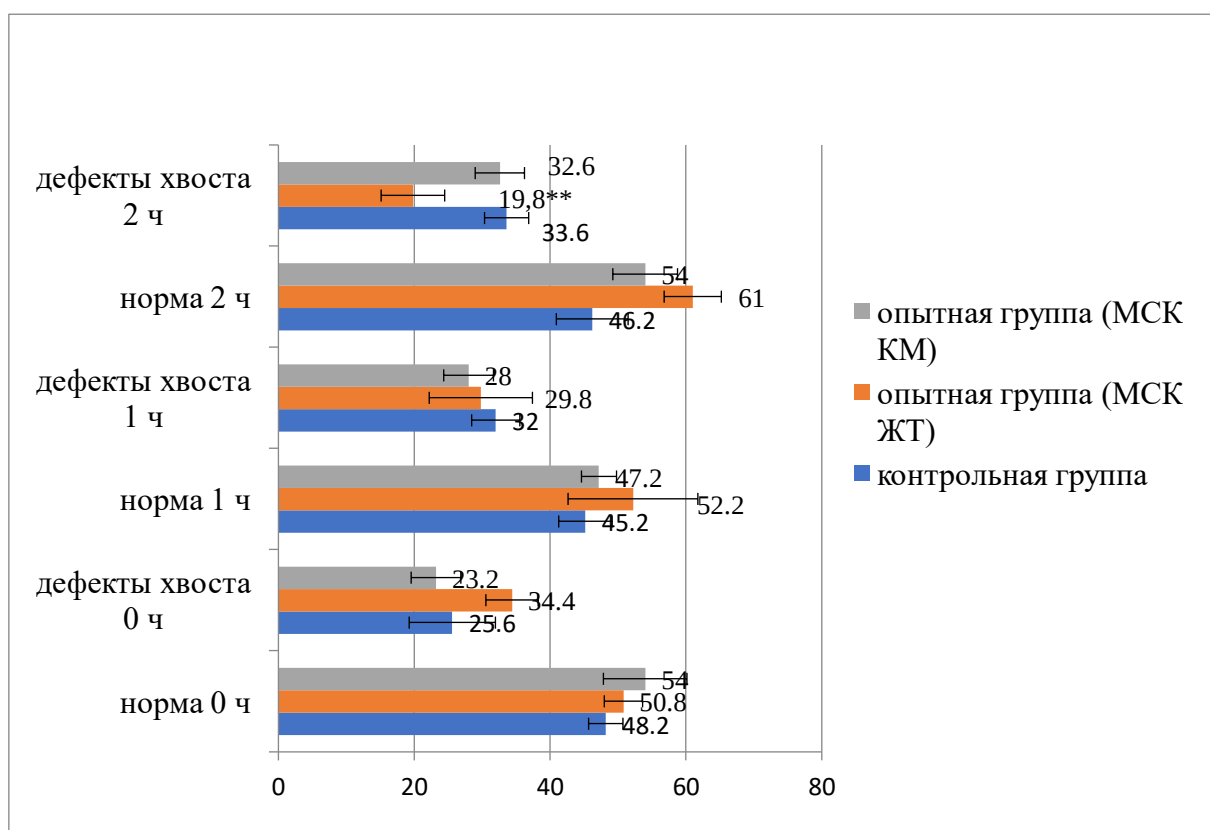


Рисунок 5 – Морфология сперматозоидов баранов при инкубации с МСК КМ и МСК ЖТ.

*Примечание: ** $p < 0,05$, по сравнению с 0 часов после взятия спермы.*

Результаты влияния лизата МСК из жировой ткани и костного мозга баранов на морфофункциональные характеристики сперматозоидов отражены в таблице 3 и рисунке 6.

Согласно данным таблицы 3, статистически значимое снижение количества нормальных сперматозоидов в процессе трехчасовой инкубации было зарегистрировано в контрольной и второй опытной (КР МСК ЖТ) группах. При этом в течение 1-го часа инкубации разница значений в контрольной и второй опытной группах составила 6,3 % ($p \leq 0,05$) и 4,4 % ($p \leq 0,01$), в течение 2-го часа – 6,5 % ($p \leq 0,05$) и 8,9 % ($p \leq 0,01$), в течение 3-го часа – 11,4 % ($p \leq 0,01$) и 11,1 % ($p \leq 0,01$) по сравнению с показателями 0 часов инкубации.

Таблица 3 – Результаты оценки морфологии сперматозоидов баранов в процессе трехчасовой инкубации с лизатом МСК (КР) ($M \pm m$, $n=10$)

Группа	Время инкубации (37 °C)	Морфология сперматозоидов				
		Нормальные, %	Дефекты сперматозоидов, %			
			Головка	Шейка	Хвост	Другие
Контрольная	0ч	51,90±2,15	8,20±1,51	11,10±1,62	26,90±2,70	1,90±1,14
	1ч	45,60±1,35**	9,40±1,15	12,90±1,36	30,60±1,76	1,50±0,70
	2ч	45,40±1,63**	7,80±0,93	10,70±1,73	35,50±1,00*	0,60±0,32
	3ч	40,50±3,51*	11,90±1,65	12,00±1,83	34,80±2,70	0,80±0,31
Первая опытная группа (КР МСК КМ)	0ч	50,80±2,51	6,60±1,02	11,30±1,74	28,00±1,95	2,30±2,20
	1ч	48,10±2,45	9,20±0,94	12,10±1,10	29,60±2,10	1,00±0,44
	2ч	46,10±1,91	8,00±1,31	11,90±1,76	32,70±2,30	1,10±0,64
	3ч	42,80±3,70	12,10±1,53*	11,80±1,70	31,70±2,20	1,60±0,70

Вторая опытная группа (КР МСК ЖТ)	0ч	50,50±1,31	6,60±0,85	12,20±1,55	30,00± 1,50	0,70± 0,52
	1ч	46,10±0,76*	8,50±0,80	12,90±1,40	32,00± 1,30	0,50± 0,32
	2ч	41,60±1,66*	11,60±1,01 *	14,20±1,91	31,70± 1,21	0,90± 0,70
	3ч	39,40±2,40*	13,90±2,14 **	14,00±2,21	33,10± 1,81	0,50± 0,24

*Примечание: * - $p \leq 0,01$, ** - $p \leq 0,05$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы).*

Что касается наличия дефектов в морфологической структуре сперматозоидов, то достоверная разница значений была определена в контрольной группе: увеличение количества сперматозоидов с дефектами хвоста на 8,6 % ($p \leq 0,01$) в процессе двухчасовой инкубации. Данная тенденция наблюдалась также в первой опытной группе (КР МСК КМ): увеличение количества сперматозоидов с дефектами головки в процессе 3-х часовой инкубации на 5,5 % ($p \leq 0,01$); во второй опытной группе (КР МСК ЖТ): увеличение количества сперматозоидов с дефектами головки в процессе 2-х и 3-х часовой инкубации на 5,0 % и 7,3 % ($p \leq 0,01$) соответственно. Таким образом, наиболее выраженное сокращение количества нормальных сперматозоидов и увеличение количества сперматозоидов с дефектами головки отмечаются в контрольной группе. Тенденция к сохранению морфологической целостности сперматозоидов наблюдается во второй опытной группе, при инкубации сперматозоидов с лизатом мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани.

Результаты двигательной активности сперматозоидов отражены на рисунке 6.

Согласно данным рисунка 6, статистически значимое уменьшение количества прогрессивно двигающихся сперматозоидов было зарегистрировано в первой и второй опытных группах в течение 2-х и 3-х часов инкубации. При этом разница значений в первой опытной группе на 3-й час инкубации составила 1,7 раза ($p < 0,01$); во второй опытной группе – 2,1 раз ($p < 0,01$). Количество прогрессивно двигающихся сперматозоидов во время

двухчасовой инкубации с лизатом МСК из жировой ткани было достоверно уменьшено ($p \leq 0,05$) и составляло $68,80 \pm 3,30$ %.

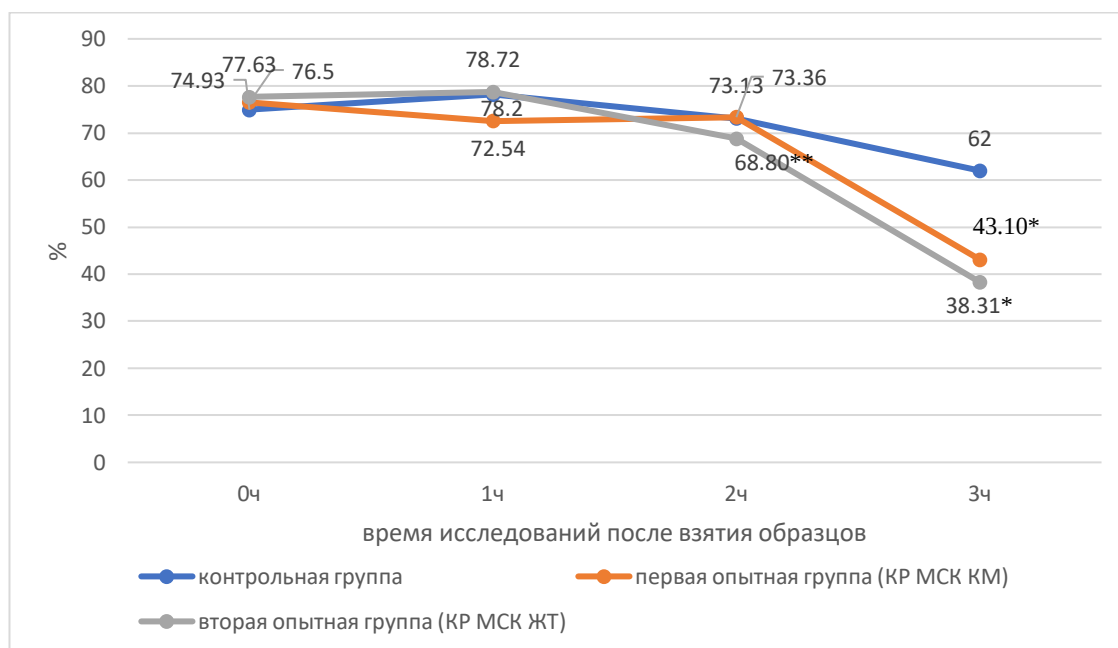


Рисунок 6 – Динамика прогрессивности движений сперматозоидов баранов в процессе трехчасовой инкубации с лизатом МСК (КР) (n=10).

*Примечание: * - $p < 0,01$, ** - $p \leq 0,05$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы).*

Было зарегистрировано уменьшение количества непрогрессивных сперматозоидов и увеличение количества неподвижных во всех исследуемых группах в течение 2-х и 3-х часов инкубации. При этом разница значений непрогрессивно двигающихся сперматозоидов в контрольной группе составила 2,1 и 4,6 раза ($p < 0,01$); в первой опытной группе (КР МСК КМ) – 4,5 и 9,3 раза ($p < 0,01$); во второй опытной группе (КР МСК ЖТ) – 3,7 и 11,4 раза ($p < 0,01$) по сравнению с результатами 0 часов инкубации.

Статистически значимое увеличение количества неподвижных сперматозоидов отмечалось в контрольной группе на 9,19 % и на 24,33 % ($p \leq 0,05$) 2 и 3 часа инкубации, в первой опытной группе (КР МСК КМ) на 9,13 % ($p \leq 0,05$), на 15,80 % и 48,10 % ($p < 0,01$) 1, 2 и 3 часа инкубации, а также во

второй опытной группе (КС МСК ЖТ) на 17,43 % и 50,00 % ($p < 0,01$) 2 и 3 часа инкубации по сравнению с данными 0 часов инкубации.

Результаты влияния кондиционированной среды МСК из ЖТ и КМ баранов на морфофункциональные характеристики сперматозоидов отражены на рисунках 7 и 8, а также таблице 4.

Согласно данным рисунка 7, в процессе трехчасовой инкубации спермы баранов с кондиционированной средой МСК наблюдалось снижение количества прогрессивнодвигающихся сперматозоидов. При этом статистически значимая разница была зафиксирована в первой опытной группе (КС МСК КМ) на 3-й час инкубации: 1,9 раза ($p < 0,01$), а также во второй опытной группе (КС МСК ЖТ) на 2-й и 3-й час инкубации по сравнению с показателями 0 часов инкубации: 1,4 раза ($p \leq 0,05$) и 2,4 ($p < 0,01$) соответственно. Нужно отметить, что наибольшее количество прогрессивнодвигающихся сперматозоидов на 3-й час инкубации при температуре 37 °С было в первой опытной группе при добавлении КС МСК из костного мозга.

Что касается непрогрессивнодвигающихся сперматозоидов, то статистически значимое снижение их количества наблюдалось во всех группах на 2-й и 3-й час инкубации по сравнению с показателями 0 часов инкубации. Разница значений в группах была следующей: в контрольной группе – 2,2 и 5,1 раз ($p < 0,01$); первой опытной группе (КС МСК КМ) – 10,4 и 14,1 ($p < 0,01$); второй опытной группе (КС МСК ЖТ) – 5,9 и 24,1 ($p < 0,01$). Количество неподвижных сперматозоидов закономерно возрастало на 2-й и 3-й часы инкубации. Статистически значимое увеличение процента неподвижных сперматозоидов было зафиксировано на 2-й час инкубации в первой и второй опытных группах на 30,3 % ($p < 0,01$) и 33,6 % ($p \leq 0,05$) соответственно, а также на 3-й час инкубации во всех исследуемых группах: на 37,5 % (контрольная группа, $p < 0,01$), на 51,4 % (первая опытная группа (КС МСК КМ), $p < 0,01$), на 58 % (первая опытная группа (КС МСК ЖТ), $p < 0,01$).

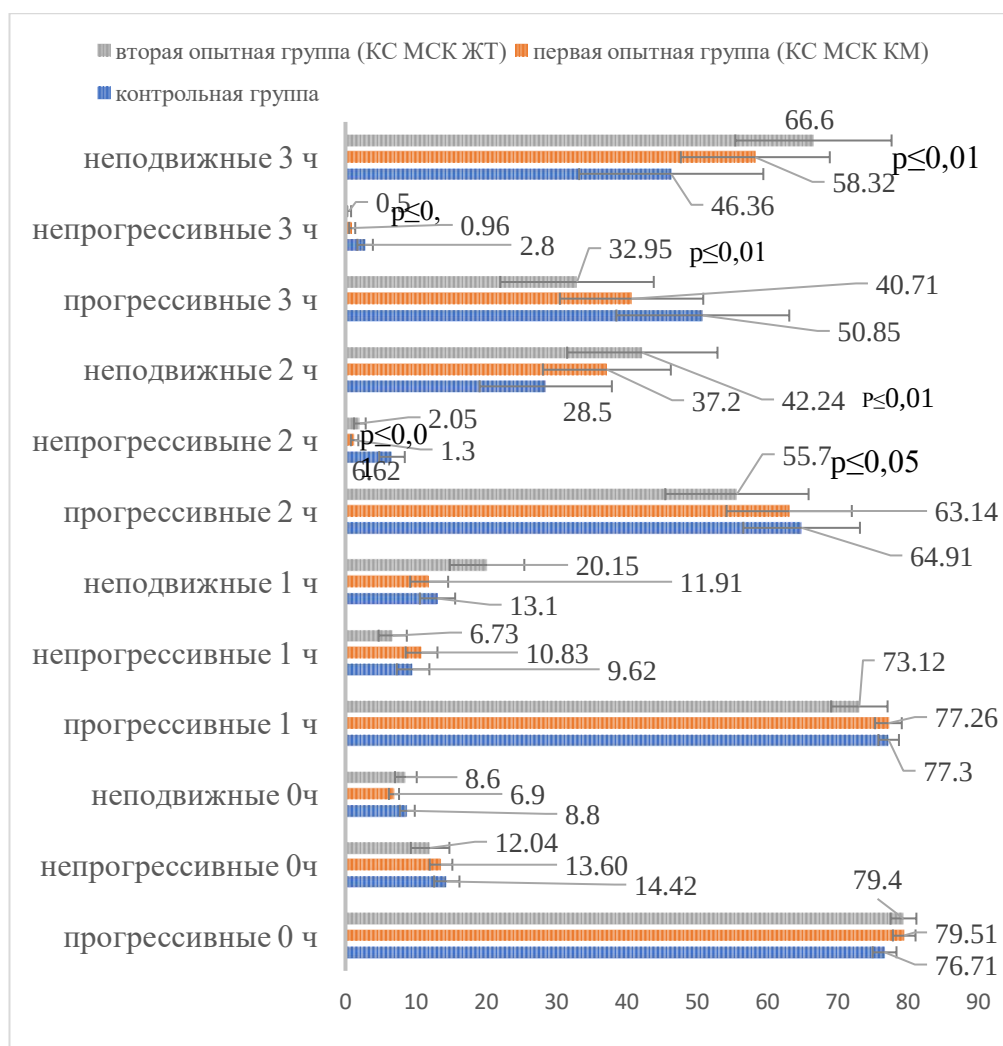


Рисунок 7 – Динамика прогрессивности движений сперматозоидов баранов в процессе трехчасовой инкубации с кондиционированной средой МСК (КС) (n=10).

*Примечание: * - $p < 0,01$, ** - $p \leq 0,05$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы).*

Результаты оценки морфологии сперматозоидов баранов в процессе трехчасовой инкубации с кондиционированной средой МСК из жировой ткани и костного мозга отражены на рисунке 8.

Количество нормальных сперматозоидов было уменьшено в контрольной группе в 1,4 раза ($p \leq 0,05$); в первой опытной группе (КС МСК КМ) в 1,2 раза ($p \leq 0,05$) 1 час инкубации; во второй опытной группе (КС МСК ЖТ) в 1,8 раз ($p < 0,01$) 3 часа инкубации по сравнению с данными 0 часов инкубации.

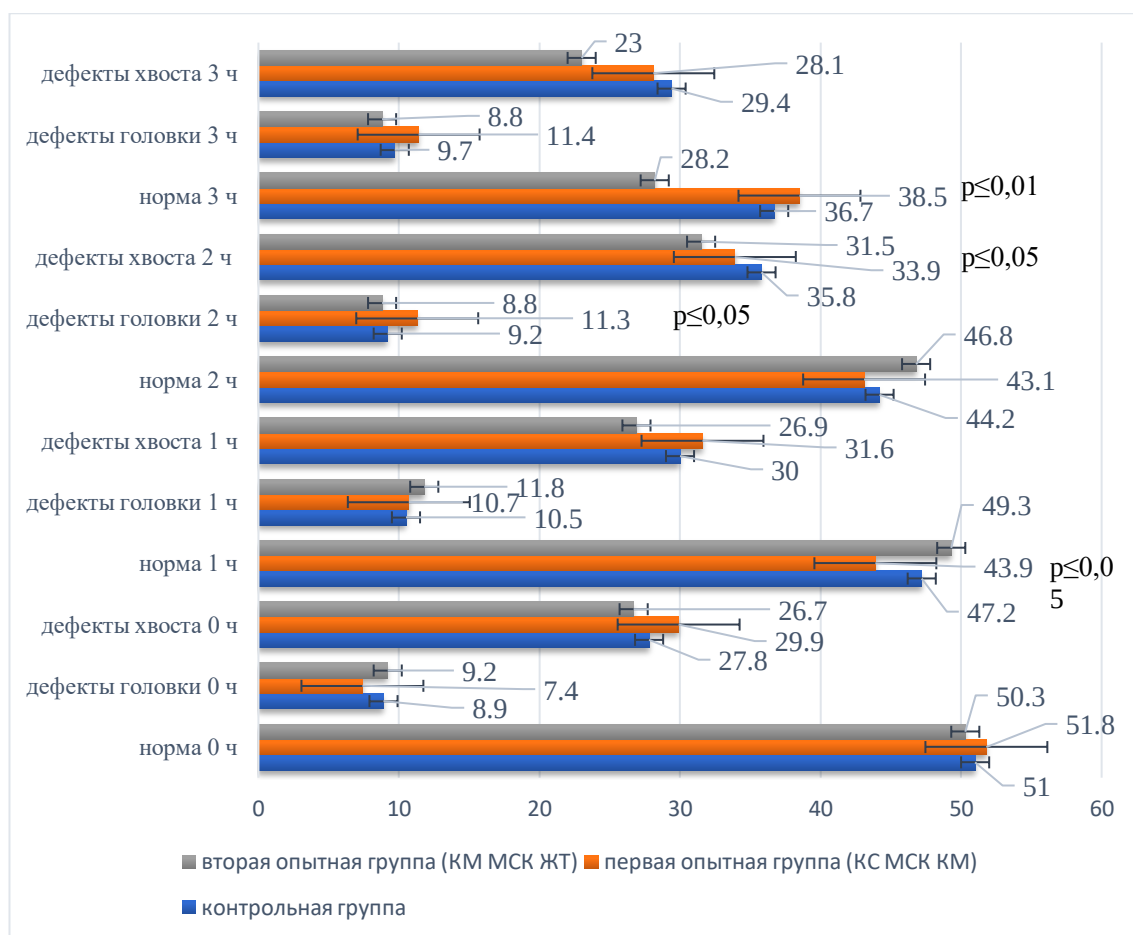


Рисунок 8 – Результаты оценки морфологии сперматозоидов баранов в процессе трехчасовой инкубации с кондиционированной средой МСК (КС) ($M \pm m$, $n=10$).

*Примечание: * - $p < 0,01$, ** - $p \leq 0,05$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы).*

Что касается дефектов сперматозоидов, то статистически значимая разница значений была зарегистрирована на 2-й час инкубации в контрольной группе (дефекты хвоста – $35,80 \pm 2,13$, $p \leq 0,05$) на 8 %, в первой опытной группе (КС МСК КМ) на 3,9 % (дефекты головки – $11,30 \pm 1,30$, $p \leq 0,05$) по сравнению с данными 0 часов инкубации. Исходя из полученных данных оценки морфологии сперматозоидов нужно отметить, что статистически значимое уменьшение количества морфологически нормальных сперматозоидов было зарегистрировано в процессе часовой инкубации с кондиционированной средой МСК из костного мозга баранов и составляло $43,90 \pm 2,22$ % ($p=0,04$).

Таблица 4 – Результаты оценки скорости движения сперматозоидов баранов в процессе трехчасовой инкубации с кондиционированной средой МСК ($M \pm m$, $n=10$)

Время проведения исследований	Показатели скорости движения сперматозоидов ($M \pm m$)			
	VSL (мкм/сек)	VCL (мкм/сек)	VAP (мкм/сек)	STR (%)
<i>Первая опытная группа (КС МСК КМ, $n=10$)</i>				
0ч	395,65±126,80	667,80±215,50	446,85±134,24	79,64±7,03
1ч	325,30±109,84	563,70±163,14	397,66±125,74	79,36±6,40
2ч	195,70±91,66	370,35±122,20	229,54±94,93	76,30±7,51
3ч	256,55±141,14	326,80±144,10	261,50±140,80	74,15±13,30
<i>Вторая опытная группа (КС МСК ЖТ, $n=10$)</i>				
0ч	387,50±103,76	550,34±115,30	412,94±104,22	91,30±3,10
1ч	384,10±135,56	526,91±147,80	407,80±134,80	85,10±5,90
2ч	280,60±122,66	439,10±168,90	301,80±127,93	93,50±2,65
3ч	157,90±67,10	220,73±86,35**	162,30±68,65	57,82±16,61
<i>Контрольная группа ($n=10$)</i>				
0ч	427,10±145,10	596,84±153,76	451,73±144,10	91,53±4,30
1ч	458,80±146,32	593,50±174,70	475,10±147,22	95,00±1,23
2ч	234,85±107,95	360,53±112,90	242,35±82,21	84,43±6,00
3ч	197,90±61,83	336,33±136,10	248,45±108,90	62,30±14,90

Примечание: * - $p < 0,01$, ** - $p \leq 0,05$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы).

При оценке кинематических параметров подвижности сперматозоидов, были получены достоверные различия значений во второй опытной группе (таблица 4). Так, достоверное снижение скорости прямолинейного движения головки (VCL) было зарегистрировано на третий час инкубации с КС МСК, полученных из жировой ткани, при этом разница значений составила 2,5 раза ($p \leq 0,05$) по сравнению с показателем 0 часов инкубации

Во второй опытной и контрольной группах наблюдалось постепенное снижение скорости прямолинейного движения головки (VSL) при этом значение данного показателя на третий час инкубации составило 157,90±67,10 мкм/сек и 197,90±61,83 мкм/сек соответственно. В первой опытной группе, напротив, наблюдалось выраженное снижение данного кинематического

показателя на второй час инкубации с разницей значений 2,1 раза по сравнению со значениями 0 часов инкубации. Кроме того, было зарегистрировано увеличение скорости прямолинейного движения головки (VSL) сперматозоидов баранов на третий час инкубации с кондиционированной средой из костного мозга. На второй час инкубации было зарегистрировано максимально низкое значение средней скорости движения головки с небольшим увеличением ее на третий час инкубации, при этом значение данного показателя в первой опытной группе (КС МСК КМ) составило $229,54 \pm 94,93$ мкм/сек, в контрольной группе – $242,35 \pm 82,21$ мкм/сек. Что касается средней скорости движения сперматозоидов по реальной траектории (VCL), то наибольшее значение данного показателя было зарегистрировано в первой опытной группе в течение первого часа инкубации с кондиционированной средой из костного мозга, при этом разница значений составила 1,2 раза. Наблюдалась выраженная степень прямолинейности направленного движения сперматозоидов на третий час инкубации с кондиционированной средой из костного мозга (КС МСК КМ), при этом значение данного показателя составило $74,15 \pm 13,30$ %.

Таким образом, инкубация спермы с МСК КС и КР МСК способствует сохранению двигательной активности сперматозоидов. МСК из костного мозга в количестве 2×10^8 кл/мл способствовали сохранению двигательной активности сперматозоидов в течение первого часа после получения спермы. При этом количество прогрессивнодвигающихся сперматозоидов в процессе трехчасовой инкубации в КС МСК из костного мозга составляет $40,71 \pm 10,20$ % ($p < 0,01$), из жировой ткани – $32,95 \pm 10,92$ % ($p < 0,01$). Можно предположить, что механизм получения данного результата основан на эффекте продуцируемых МСК биологически активных веществ (Пушкина, В. С. с соавтор. 2024.).

2.2.3 Эффективность применения мезенхимальных стволовых клеток и их производных в процессе криоконсервации и после оттаивания

Целью третьего этапа исследований явилось изучение эффективности криоконсервации с добавлением МСК КМ и ЖТ в качестве компонента разбавителя. Так, согласно результатам микроскопической оценки качества спермы баранов после разбавления и формирования трех групп, количество прогрессивнодвигающихся сперматозоидов составляло $76,40 \pm 5,90$ % (контрольная группа) и $81,11 \pm 2,40$ % - $81,61 \pm 1,10$ % (опытные группы). Количество морфологически нормальных сперматозоидов в контрольной группе при разбавлении спермы (OptiXcell) после ее центрифугирования составило $46,70 \pm 5,11$ %, в опытных группах: $44,70 \pm 3,90$ % (OptiXcell +МСК КМ) и $48,20 \pm 3,30$ % (OptiXcell +МСК ЖТ). Что касается результатов оценки жизнеспособности сперматозоидов, то процент живых сперматозоидов при смешивании их с готовой средой OptiXcell составил $59,60 \pm 1,21$ %, с готовой средой и МСК КМ – $55,40 \pm 2,95$ %, с готовой средой и МСК ЖТ – $63,20 \pm 1,10$ %. Процент интактных акросом сперматозоидов после разбавления с готовой синтетической средой и добавления МСК варьировал от $66,30 \pm 1,10$ до $65,67 \pm 1,47$.

Результаты оценки морфологии сперматозоидов в течение четырехчасовой инкубации (38 °С) после оттаивания отражены на рисунке 9.

При анализе количественных изменений нормальных сперматозоидов, достоверные значения были зарегистрированы во всех исследуемых группах. Так, статистически значимое снижение количества морфологически нормальных сперматозоидов после оттаивания было зафиксировано в следующих группах: в контрольной группе в 1,4 раза (2 часа, $p \leq 0,05$), в 1,7 раза (4 часа, $p < 0,01$); первой опытной группе в 1,5 раза (4 часа, $p < 0,01$); второй опытной группе в 1,4 раза (0 часов, $p < 0,01$), в 1,3 (2 и 4 часов, $p \leq 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно) по сравнению с результатами после разбавления образцов спермы (OptiXcell, OptiXcell +МСК КМ/ЖТ).

Что касается структурных изменений сперматозоидов, достоверное увеличение количества сперматозоидов с дефектами головок наблюдалось преимущественно в контрольной (в 1,6 (2 часа, $p \leq 0,05$) и 1,8 (4 часа, $p < 0,01$) раз) и второй опытной группах (в 1,7 (0 часов, $p \leq 0,05$), 1,8 (2 часа, $p < 0,01$) и 1,6 раз (4 часа, $p \leq 0,05$)) по сравнению с результатами после смешивания с готовой синтетической средой и МСК.

Статистически значимое увеличение количества сперматозоидов с дефектами хвостов было зарегистрировано во всех исследуемых группах. При этом данная тенденция наблюдалась на всех этапах инкубации (0,2 и 4 часов) в контрольной и первой опытной группах с разницей значений, равной 1,5-1,4 ($p \leq 0,05$); 1,7-1,6 ($p < 0,01$); 1,9-1,8 ($p < 0,01$) по сравнению с результатами, полученными после разбавления образцов спермы. Что касается второй опытной группы, то статистически значимое увеличение сперматозоидов с дефектами хвостов было зафиксировано на второй час инкубации спермы после ее разморозки. При этом разница значений составила 1,3 раза ($p < 0,01$) по сравнению с результатами после разбавления. Таким образом, наиболее выраженные изменения структурной целостности сперматозоидов после разморозки и четырехчасовой инкубации отмечалось в контрольной группе (разбавитель OptiXcell). Примечательно, что на второй и четвертый часы инкубации образцов в готовой среде и МСК ЖТ было зарегистрировано увеличение количества нормальных сперматозоидов ($36,10 \pm 3,75$ % и $36,00 \pm 2,61$ %) во второй опытной группе и снижение количества сперматозоидов с дефектами головок на четвертый час инкубации по сравнению с данными 0 часов ($34,50 \pm 2,40$ %). Кроме того, наблюдалось невыраженное увеличение количества сперматозоидов с дефектами хвостовой части по сравнению с контрольной и первой опытной группами.

Результаты оценки прогрессивности движений сперматозоидов в процессе криоконсервации и в течение четырехчасовой инкубации после оттаивания, находящихся в готовых синтетических средах с добавлением МСК КМ/ЖТ, отражены на рисунке 10.

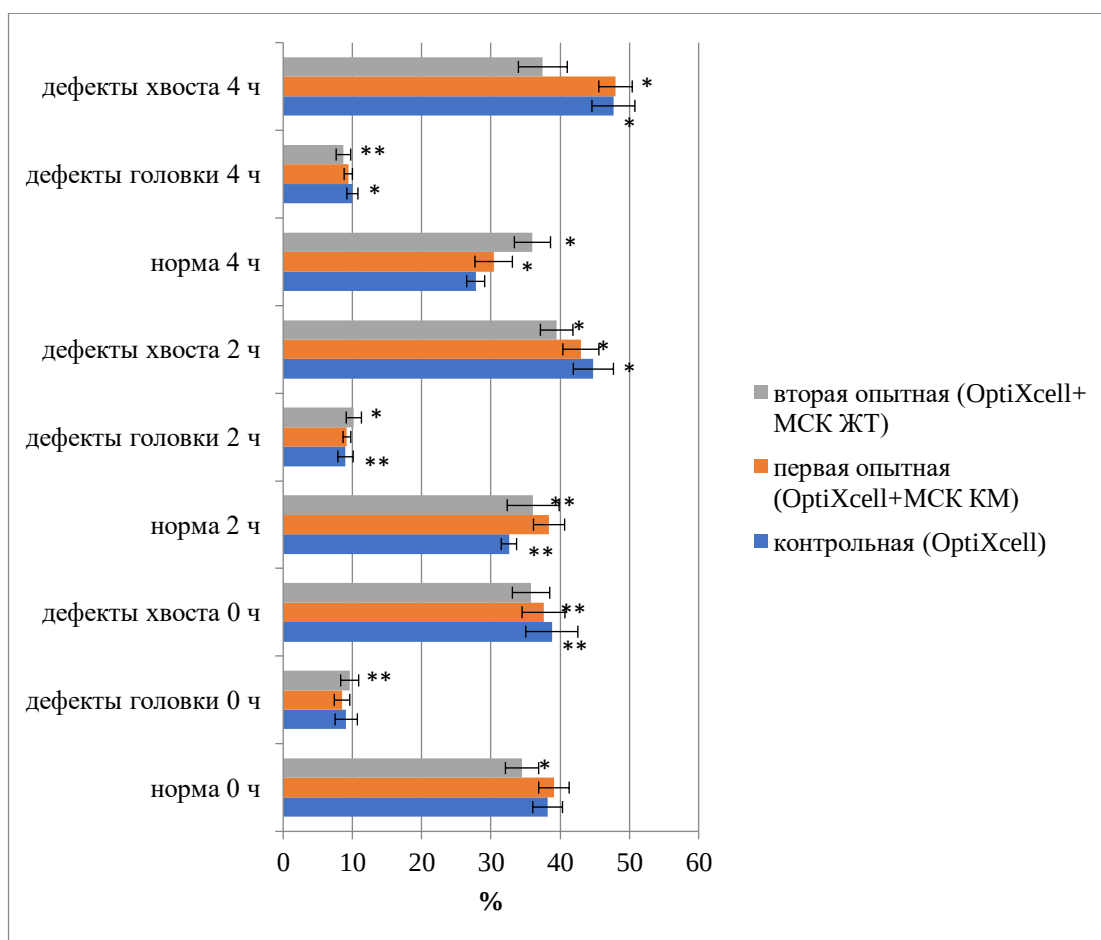


Рисунок 9 – Результаты оценки морфологии сперматозоидов баранов после оттаивания при четырехчасовой инкубации с МСК (n=10).

*Примечание: * - $p < 0,01$, ** - $p \leq 0,05$ (достоверно по сравнению с результатами после разбавления образцов спермы).*

Проводя анализ двигательной активности сперматозоидов, нужно отметить статистически значимое сокращение количества прогрессивнодвигающихся сперматозоидов во всех исследуемых группах по сравнению с данными после разбавления.

При этом в контрольной группе было зафиксировано постепенное угасание двигательной способности в течение четырехчасовой инкубации после оттаивания с разницей значений в 2,6 (0 и 2 часа после оттаивания, $p < 0,01$) и 8,9 (4 часа после оттаивания, $p < 0,01$) раз, чего нельзя сказать о морфофункциональных характеристиках сперматозоидов опытных групп.

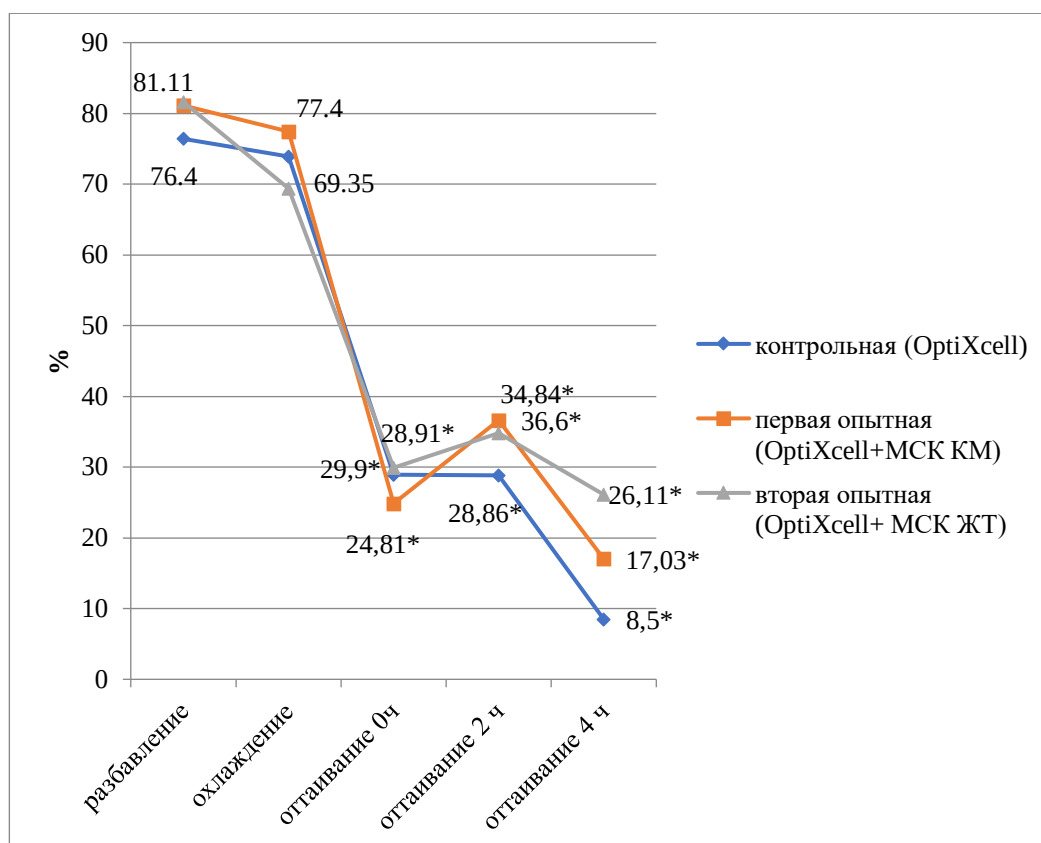


Рисунок 10 - Динамика прогрессивности движений сперматозоидов баранов в процессе криоконсервации и в течение четырехчасовой инкубации после оттаивания (n=10).

*Примечание: * - $p < 0,01$ (достоверно по сравнению с результатами после разбавления образцов спермы).*

Картина движений сперматозоидов, разбавленных OptiXcell с добавлением МСК КМ/ЖТ, была следующей: после оттаивания было зафиксировано сокращение количества прогрессивнодвигающихся сперматозоидов в 3,2 (МСК КМ, $p < 0,01$) и 2,7 (МСК ЖТ, $p < 0,01$) раз, 2 часа после оттаивания – 2,2 (МСК КМ, $p < 0,01$) и 2,3 (МСК ЖТ, $p < 0,01$) раз, 4 часа после оттаивания – 4,7 (МСК КМ, $p < 0,01$) и 3,1 (МСК ЖТ, $p < 0,01$) раз. Количество неподвижных сперматозоидов на 4-й час инкубации после оттаивания было следующим: $91,64 \pm 2,04$ % (контрольная группа), $82,70 \pm 2,30$ % (первая опытная группа), $72,71 \pm 5,36$ % (вторая опытная группа). Таким образом, наибольшая переживаемость сперматозоидов отмечалась в опытных группах при использовании разбавителя OptiXcell и МСК.

Результаты оценки жизнеспособности сперматозоидов баранов в процессе криоконсервации и в течение четырехчасовой инкубации после оттаивания отражены на рисунке 11.

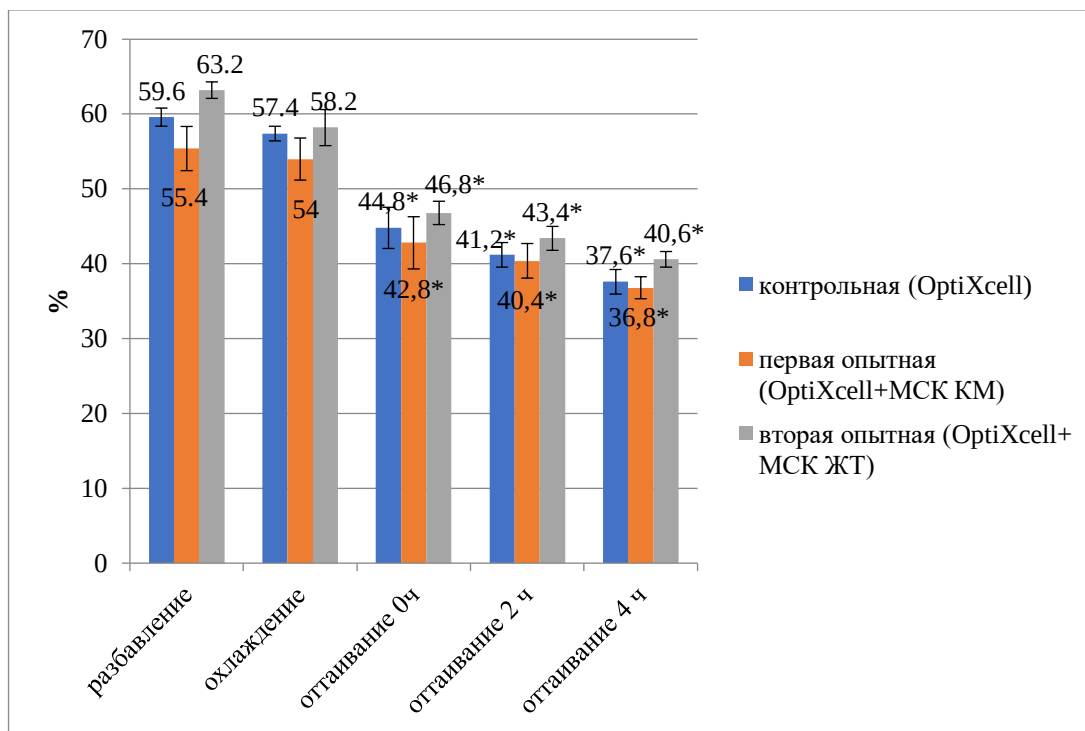


Рисунок 11 – Результаты оценки жизнеспособности сперматозоидов баранов в процессе криоконсервации и в течение четырехчасовой инкубации после оттаивания (n=10).

*Примечание: * - $p \leq 0,01$ (достоверно по сравнению с результатами после разбавления).*

Согласно данным рисунка 11, достоверное сокращение количества жизнеспособных сперматозоидов баранов после проведения глубокой заморозки и оттаивания было зарегистрировано во всех исследуемых группах. При этом разница значений после оттаивания (0, 2 и 4 часов) в контрольной группе составляла 1,3; 1,4 и 1,6 раз ($p \leq 0,01$); в опытных группах – 1,3; 1,4 и 1,5 раз ($p \leq 0,01$) по сравнению с результатами после разбавления образцов спермы.

Результаты оценки целостности акросомальной мембраны сперматозоидов баранов до и после криоконсервации представлены на рисунке 12.

Анализ данных, полученных в результате оценки целостности акросомы, указывает на одинаковую тенденцию к сокращению количества сперматозоидов с интактными акросомами после оттаивания образцов. В контрольной группе разница значений между показателями после разбавления и оттаивания (0,2 и 4 часа) составляла 1,3; 1,4 и 1,7 ($p<0,01$) раз. В первой опытной группе наблюдалась такая же тенденция с небольшой разницей при сравнении значений на 4-й час инкубации (1,6 раз, $p<0,01$), во второй группе – напротив, 0 и 2 часа после оттаивания разница значений составляла 1,3 ($p<0,01$) раза, на 4-й час инкубации разница была такой же, как и в контрольной группе.

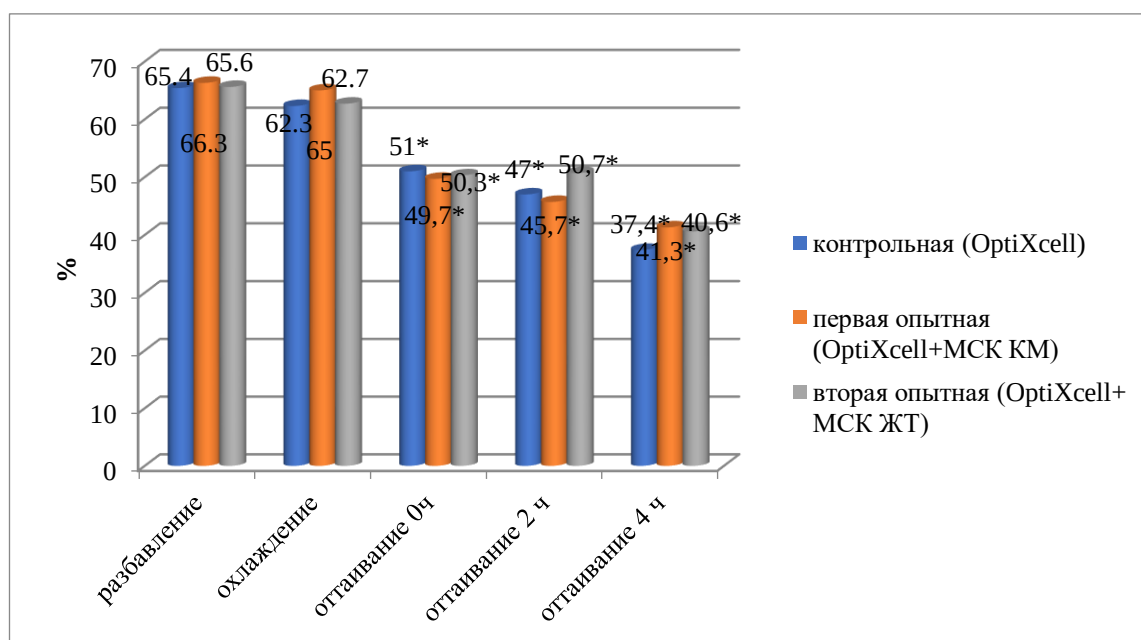


Рисунок 12 – Результаты оценки целостности акросомы сперматозоидов баранов до и после криоконсервации (n=10).

*Примечание: * - $p<0,01$ (достоверно по сравнению с результатами после разбавления).*

Целью четвертого этапа исследований явилось изучение эффективности применения МСК КМ и ЖТ в качестве реабилитационной среды после оттаивания. Так, согласно макроскопической оценке качества спермы после взятия были получены следующие результаты: белый цвет и специфический

запах, объем в среднем составлял $0,8 \pm 0,05$ мл, концентрация – $7,51 \pm 0,85$ млрд. Кроме того, после взятия и охлаждения спермы были определены следующие морфофункциональные особенности: количество прогрессивнодвигающихся сперматозоидов – $75,38 \pm 2,25$ % и $81,30 \pm 1,67$ %, количество сперматозоидов без дефектов – $57,70 \pm 1,84$ % и $51,10 \pm 1,75$ %, количество жизнеспособных сперматозоидов – $73,29 \pm 2,77$ % и $75,00 \pm 3,50$ % соответственно.

Результаты влияния МСК из жировой ткани и костного мозга баранов на морфофункциональные характеристики сперматозоидов после криоконсервации отражены на рисунках 13-16.

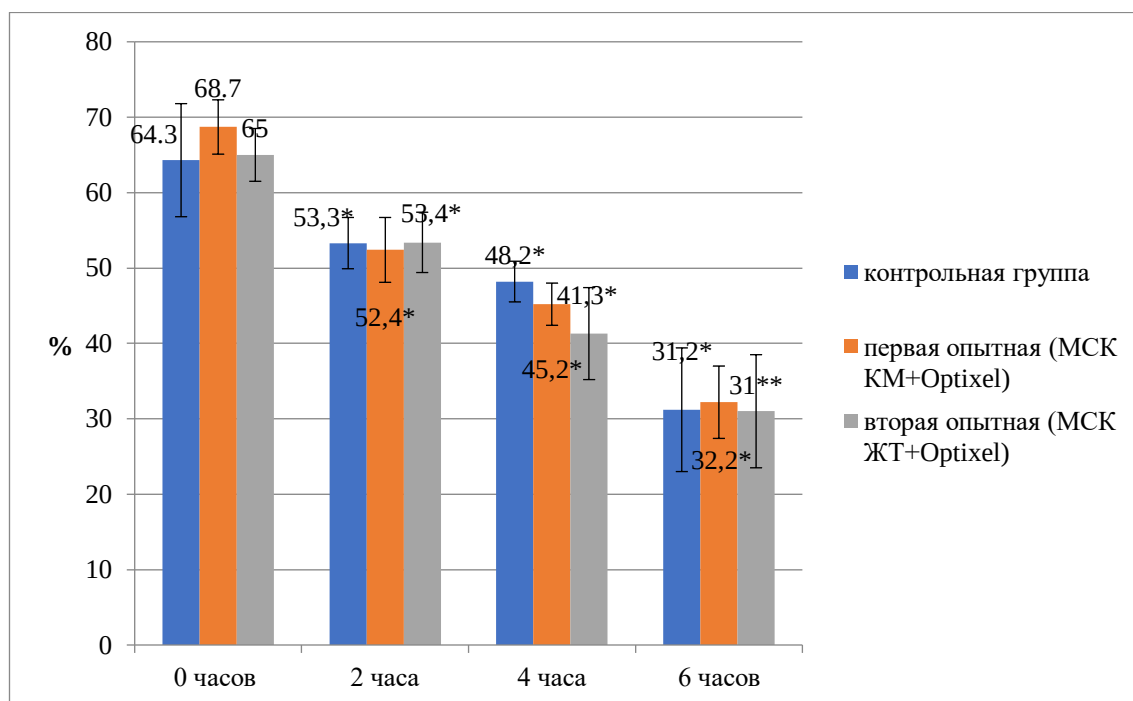


Рисунок 13 – Результаты оценки жизнеспособности сперматозоидов баранов в процессе шестичасовой инкубации с МСК (ЖТ и КМ) (n=10).

*Примечание: * - $p < 0,01$, ** - $p \leq 0,05$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы).*

Согласно данным рисунка 13, достоверное снижение количества живых сперматозоидов было зарегистрировано во всех исследуемых группах через 2, 4 и 6 часов инкубации при температуре 38 °С. При этом разница значений с показателями 0 часов инкубации в контрольной группе составила 1,2 ($p < 0,01$),

1,3 ($p<0,01$), 2,1 ($p<0,01$) раз; в первой опытной группе (МСК КМ) – 1,3 ($p<0,01$), 1,5 ($p<0,01$), 2,1 ($p<0,01$) раз; во второй опытной группе (МСК ЖТ) – 1,2 ($p<0,01$), 1,5 ($p<0,01$), 2,1 ($p<0,05$) раз соответственно. Таким образом, наиболее выраженная потеря жизнеспособности, а также способности клеточной мембраны выдерживать осмотическое давление без разрыва наблюдались в опытных группах.

При добавлении МСК из костного мозга в сперму баранов после криоконсервации (рисунок 14) наблюдалось увеличение количества нормальных сперматозоидов в 1,1 раза ($p\leq 0,01$) спустя 4 часа инкубации по сравнению с результатами в 2 часа. Кроме того, наибольшее количество нормальных сперматозоидов по окончании шестичасовой инкубации было зафиксировано в первой опытной группе (МСК КМ) и составило $44,2\pm 2,75\%$. Можно предположить, что данная разница связана с регенеративными свойствами МСК. Наиболее выраженная тенденция к сокращению количества нормальных сперматозоидов наблюдалась в контрольной и второй опытной (МСК ЖТ) группах после криоконсервации. Так, разница значений с показателями 0 часов инкубации в контрольной группе составила 1,1 раза ($p\leq 0,05$) спустя 2 и 4 часа, 1,2 раза ($p\leq 0,01$) спустя 6 часов инкубации; во второй опытной группе – 1,1 ($p\leq 0,01$) и 1,2 ($p\leq 0,01$) раза спустя 4 и 6 часов инкубации соответственно.

При морфологической оценке сперматозоидов (рисунок 14) наибольшие изменения были зафиксированы в хвостовой части сперматозоидов, как следствие негативного воздействия низких температур. Было зафиксировано достоверное увеличение количества сперматозоидов с дефектами хвоста в контрольной группе в 1,1 ($p\leq 0,01$) 2 и 4 часа инкубации, в 1,3 ($p\leq 0,01$) раза спустя 6 часов инкубации по сравнению с показателями 0 часов инкубации.

Подобная тенденция наблюдалась и в опытных группах, при этом наиболее выраженные изменения были зафиксированы во второй опытной группе (МСК ЖТ) на протяжении всех этапов исследований. Разница значений составила 1,1 раза ($p\leq 0,05$) по сравнению с результатами 0 часов инкубации.

При инкубации сперматозоидов с МСК из костного мозга наблюдалось сокращение количества половых клеток с дефектами хвостов по результатам исследований 4 – 2 часа инкубации. При этом разница значений составила 1,3 раза ($p=0,0001$). Таким образом, полученные данные оценки морфологии сперматозоидов баранов после криоконсервации указывают на положительный пролонгированный регенеративный эффект МСК из костного мозга на структурную целостность половых клеток.

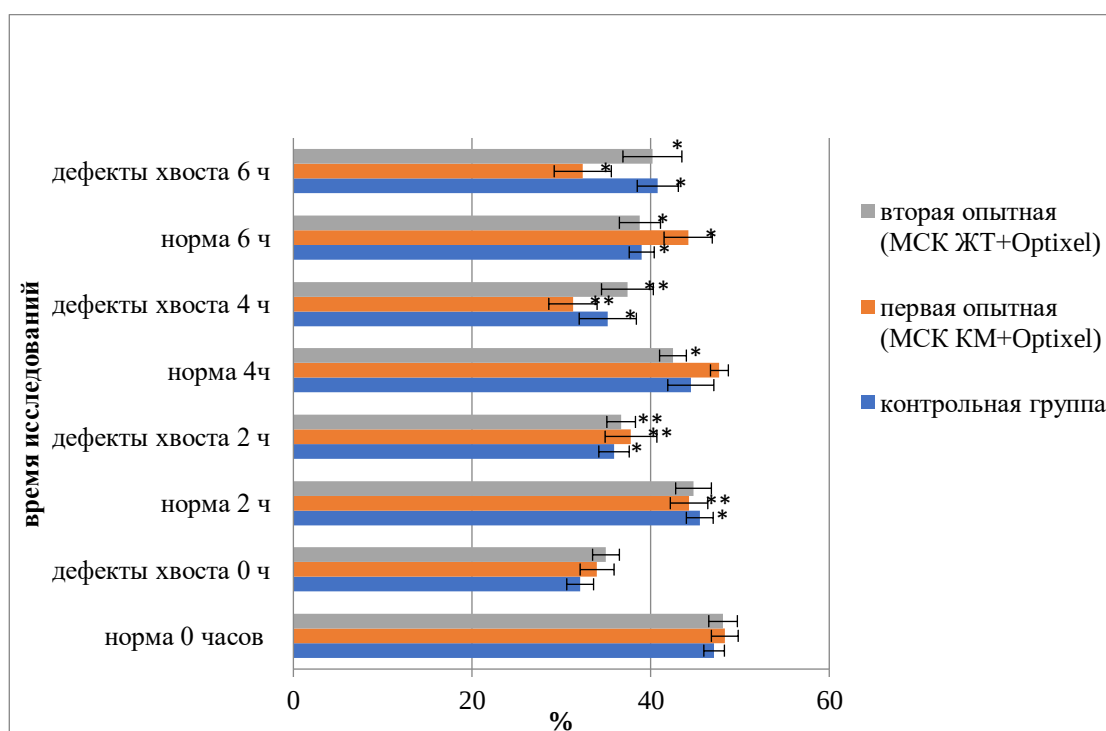


Рисунок 14 - Результаты оценки морфологии сперматозоидов баранов в процессе шестичасовой инкубации с МСК (n=10).

*Примечание: * - $p<0,01$, ** - $p\leq0,05$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы).*

Результаты оценки прогрессивности движений сперматозоидов после криоконсервации, находящихся в различных средах, в процессе шестичасовой инкубации, отражены на рисунке 15.

Согласно данным рисунка 15, после криоконсервации спермы баранов наблюдалось сокращение количества прогрессивно двигающихся сперматозоидов во всех исследуемых группах. При этом в контрольной и

первой опытной (МСК КМ) группах была зафиксирована одинаковая достоверная динамика изменений, а именно: сокращение количества прогрессивнодвигающихся сперматозоидов спустя 4 часа инкубации в 1,3 ($p<0,01$) и 2,9 ($p<0,01$) раз и, напротив, восстановление двигательной активности и увеличение процента прогрессивнодвигающихся сперматозоидов на 1,45 % (контрольная группа) и 15,25 % (опытная группа МСК КМ) через 2 часа исследований.

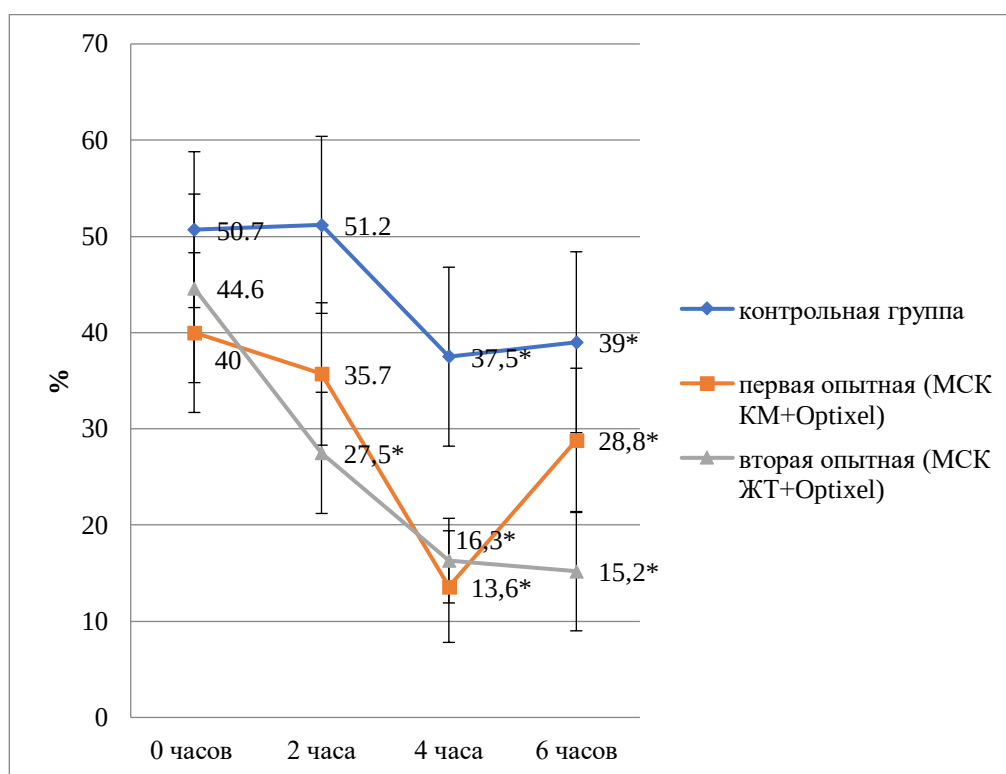


Рисунок 15 – Динамика прогрессивности движений сперматозоидов баранов в процессе шестичасовой инкубации с МСК (n=10).

*Примечание: * - $p<0,01$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы).*

При этом разница значений с показателями 0 часов инкубации в контрольной группе составила 1,3 раза ($p<0,01$), в первой опытной группе - 1,4 раза ($p<0,01$).

Во второй опытной группе (МСК ЖТ) отмечалось сокращение количества прогрессивнодвигающихся сперматозоидов в 1,6 ($p<0,01$), 2,7

($p<0,01$) и 2,9 ($p<0,01$) раз спустя 2, 4 и 6 часов инкубации после криоконсервации.

Таким образом, наиболее выраженное сохранение двигательной активности сперматозоидов на протяжении шестичасовой инкубации спермы после криоконсервации наблюдалось в контрольной группе. Стоит отметить положительное влияние МСК из костного мозга в аспекте их восстановительных и регенеративных свойств на структуру клетки.

Результаты оценки целостности акросомы сперматозоидов отражены на рисунке 16.

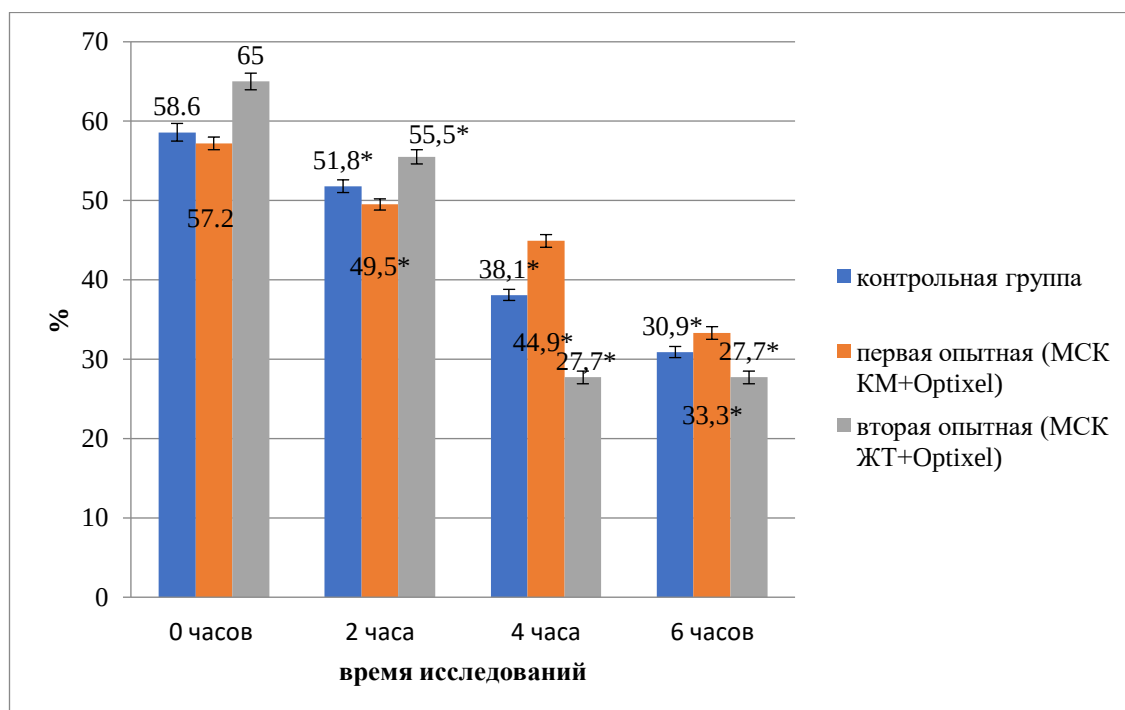


Рисунок 16 - Результаты оценки целостности акросомы сперматозоидов баранов в процессе шестичасовой инкубации с МСК (n=10).

*Примечание: * - $p<0,01$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы).*

Согласно данным рисунка 16, во всех исследуемых группах наблюдалась тенденция к сокращению количества сперматозоидов с интактными акросомами. Так, разница значений 2, 4 и 6 часов инкубации по сравнению с

данными 0 часов была следующей: контрольная группа – 1,1; 1,5 и 1,9 раз ($p<0.01$); первая опытная группа (МСК КМ) – 1,1; 1,3 и 1,7 раз ($p<0.01$); вторая опытная группа (МСК ЖТ) – 1,1 и 2,3 ($p<0.01$) раз соответственно. Наибольшее количество сперматозоидов с интактными акросомами отмечалось в первой опытной группе при шестичасовой инкубации с МСК из костного мозга.

Таким образом, было обнаружено положительное влияние МСК в аспекте их восстановительных и регенеративных свойств на структуру клетки. Так, на второй и четвертый часы инкубации образцов в готовой среде с добавлением МСК ЖТ было зарегистрировано увеличение количества нормальных сперматозоидов ($36,10\pm3,75\%$ и $36,00\pm2,61\%$) во второй опытной группе и снижение количества сперматозоидов с дефектами головок на четвертый час инкубации по сравнению с данными 0 часов ($34,50\pm2,40\%$). При этом наблюдалось снижение двигательной активности в 1,6 ($p<0,01$), 2,7 ($p<0,01$) и 2,9 ($p<0,01$) раз спустя 2, 4 и 6 часов инкубации после криоконсервации (Пушкина, В. С. с соавтор. 2024.).

2.2.4 Выделение, накопление и криоконсервация мезенхимальных стволовых клеток баранов

Жировую ткань (ЖТ) и костный мозг (КМ) получали после убоя баранов в частном хозяйстве Ленинградской области. ЖТ вырезали в области брюшины сразу после убоя. Образцы помещали в стерильную пробирку с 10 мл транспортировочной среды - PBS, содержащий пенициллин и стрептомицин (Gibco, США). Пробирки с биоматериалом доставляли в лабораторию при 8 °С в течение 3 ч. В условиях ламинарного бокса жировую ткань тщательно промывали стерильным буфером PBS с добавлением высоких концентраций цефтриаксона и амфотерицина В (Синтез, Россия), измельчали при помощи микроножниц. Полученную взвесь переносили в пробирку, затем в нее добавляли раствор коллагеназы (тип 2) (ПанЭко, Россия) из расчета 500 ед/мл и инкубировали 45 мин при 37 °С при постоянном помешивании. По

окончании инкубации, клетки осаждали центрифугированием. Жидкую фазу с крупными кусками ткани и зрелыми жировыми клетками удаляли пипеткой Пастера, осадок ресуспендировали в среде α MEM. Полученную суспензию фильтровали через сетчатый фильтр с размером пор 100 мкм, фильтрат вновь центрифугировали, полученный осадок разводили средой α MEM:FBS (9:1) с добавлением 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина и высевали в культуральные флаконы (SPLLifeSciences, Корея). Полученные культуры помещали в CO₂- инкубатор и растили при температуре 37 °C и содержании 5 % CO₂. Через 24 ч ростовую среду с неприкрепившимися клетками удаляли, флаконы несколько раз тщательно промывали PBS с добавлением антибиотиков и снова добавляли аналогичную ростовую среду. Смену среды производили каждые 72 ч. Из 3 образцов жировой ткани, полученных от 3-х баранов, из 1-го жизнеспособные клетки не выделились, 2-ой и 3-й сформировали конфлюэнтный монослой к 10 суткам после выделения. После 1-го пересева культура, полученная из 2-го образца, имела скрытую контаминацию и, несмотря на промывание раствором с использованием увеличенной концентрации антибиотиков и антимикотиков, погибла. Культура, полученная из 3-го образца, сформировала конфлюэнтный монослой за 96 ч во всех флаконах. Клетки были вновь пересеяны и через 72 ч во всех флаконах был сформирован 90 % монослой. Из всех клеток, собранных на 2-м пассаже, был получен общий пул. Оттуда были посеяны клетки в 24-луночные планшеты для проведения мультилинейной дифференцировки и во флакон на ростовую среду α MEM:FBS (9:1) без антибиотиков. Остальные клетки были заморожены в концентрации 2×10^6 кл/мл по 1 мл в криобирке. Был использован следующий протокол замораживания: инкубация при комнатной температуре 30 мин, 1 час при -20 °C, затем на 1 час в пары жидкого азота (-80 °C), после чего поместили в сосуд Дьюара в жидкий азот (-196 °C). Данный протокол 3х этапного замораживания является универсальным для большинства адгезивных культур при отсутствии морозильного ларя, поддерживающего температуру - 80 °C. В результате удастся обеспечить

снижение температуры в среднем на 1 °C /мин до -80 °C, что обеспечивает формирование кристаллической решетки льда, не повреждающей мембраны клетки и внутриклеточных структур. Через 5 суток 1 образец был разморожен согласно принятому протоколу – в течение 30 сек на водяной бане с температурой 40 °C. Клетки были высеяны в ростовую среду α MEM:FBS (9:1) без антибиотиков.

КМ брали из бедренной кости иглой для аспирации костного мозга и переносили в стерильную пробирку с гепарином. Пробирки с биоматериалом доставляли в лабораторию при 8 °C в течение 3 ч. В условиях ламинарного бокса образцы КМ разводили 1:1 буфером PBS с высоких концентраций цефтриаксона и амфотерицина В, инкубировали при комнатной температуре 5 мин, затем центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли, осадок разводили стерильным раствором PBS с добавлением пенициллина и стрептомицина. Отмывание клеток проводили еще раз аналогичным образом. Полученный осадок разводили средой α MEM:FBS (9:1) с добавлением пенициллина и стрептомицина и высевали в культуральные флаконы (SPLLifeSciences, Корея). Через 24 ч, ростовую среду с неприкрепившимися клетками удаляли, флаконы несколько раз тщательно промывали PBS с добавлением пенициллина и стрептомицина и снова добавляли аналогичную ростовую среду. Процедуру повторяли еще через 24 ч культивирования. В дальнейшем смену среды производили каждые 72 ч. Монослой формировался к 10 суткам после выделения. Культуры, полученные из образцов 1 и 2, также оказались контаминированы, что выражалось в полной гибели клеток и бурном росте микроорганизмов (образец 1) и чрезвычайно низкой скорости роста (образец 2), что также говорит о скрытой контаминации. Из 3 образца была получена культура МСК КМ с хорошей скоростью роста и морфологией клеток. В дальнейшем МСК пассировали для увеличения количества, высевали в планшеты для проведения дифференцировки, переводили на среду без антибиотиков и криоконсервировали-размораживали для проверки

жизнеспособности описанным для МСК ЖТ способом. Всего было депонировано 16 криопробирок МСК ЖТ и 18 криопробирок МСК КМ.

Таким образом, 2-ой и 3-й образцы сформировали конфлюэнтный монослой к 10 суткам после выделения. Полученные данные указывают на то, что в обоих флаконах монослой был сформирован за 72 ч. Соответственно, использованный протокол замораживания-оттаивания обеспечивает высокую жизнеспособность клеток и подходит для криоконсервирования МСК барана (Pushkina, V. S. et al., 2025).

2.2.5 Определение предельных пассажей культивирования, морфологических и функциональных особенностей мезенхимальных стволовых клеток баранов

Для построения кривой роста и расчета времени удвоения популяции производили регулярный посев клеток в количестве 5×10^4 кл/матрас, что соответствует 2 кл/см^2 , и подсчет снятых клеток через 72-96 ч роста. Исходя из этих данных были посчитаны индекс пролиферации (ИП) – отношение количества выросших клеток (N_t) к количеству посеянных (N_0) и время удвоения популяции, которое рассчитывалось по формуле $td = t / \log_2 (N_t / N_0)$, где t – время роста культуры, ч. Пик скорости пролиферации клеток приходится на 15-25 пассажи. Время удвоения популяции составляет на начальном этапе культивирования (3-6 пассажей) для обеих культур 20-26 ч, на пике роста 10-14 ч, и к текущему пассажу роста культур (37 пассаж) – 13-16 ч. Проведенные исследования выявили, что скорость роста культуры МСК ЖТ ниже, чем МСК КМ.

В культуре МСК ЖТ наблюдались клетки с фибробластоподобной морфологией, встречались мелкие округлые клетки, единичные колонии полигональных клеток эпителиоподобной морфологии и единичные большие плоские клетки. В культуре МСК КМ присутствовали кроме фибробластоподобных клетки округлой формы разного размера, вероятно адгезивная фракция ГСК (гемопэтические стволовые клетки). К 4-му пассажу

обе культуры стали однородными, все посторонние клетки элиминировались. Форма клеток стала фибробластоподобной с характерными 2-4 отростками, в зависимости от плотности клеток в месте наблюдения. Отмечено также, что МСК ЖТ были крупнее МСК КМ. Все различия между культурами стали не видны к 15-му пассажу, когда культуры активно пролиферировали и плотность монослоя стала высокой.

На 30-м пассаже было проведено окрашивание монослоя красителями Oil Red O и ализариновым красным для идентификации клеток, которые могли самостоятельно дифференцироваться. Окрашенных клеток ни в одном варианте обнаружено не было.

Таким образом, морфология клеток в обеих культурах на 0-3-м пассаже была гетерогенной. А также, несмотря на большой пассаж клетки сохранили свои стволовые характеристики (Pushkina, V. S. et al., 2025).

2.2.6 Результаты кариологического анализа и направленной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток

Для кариологического анализа клетки МСК ЖТ на стадии логарифмического роста обрабатывали 0,6 мкг/мл колхицина в среде в течение 2 ч при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Делящиеся клетки снимали. После обработки гипотоническим 0,56 %-ным раствором KCl в течение 15 мин при 37 °С клетки осаждали центрифугированием. МСК фиксировали смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3:1). Полученную суспензию использовали для приготовления хромосомных препаратов. Результат кариологического анализа культуры на 3 пассаже показал, что модальное число хромосом составляет 54 и соответствует диплоидному набору хромосом этого вида животного.

Для проведения адипогенной дифференцировки культуры МСК ЖТ и МСК КМ высевались в концентрации 3×10^4 кл/лунку. Для проведения остеогенной дифференцировки культуры МСК ЖТ и МСК КМ высевались в концентрации 6×10^4 кл/лунку. В контрольных лунках всех планшетов культивирование проводили в среде DMEMHG (Gibco, США) с добавлением

15 % FBS, 1 % L-глутамина, 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. В лунках, где планировалось проведение дифференцировки, клетки культивировались в среде DMEMHG (Gibco, США) с добавлением 10 % FBS, 1 % L-глутамина, 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Адипофакторы – 0,5 мМ 3-изобутил-1-метилксантина, 1 мкМ дексаметазона, 1 мкМ инсулина, 0,2 мМ индометацина – вносили в соответствующие планшеты через 24 ч. Дифференцировка проводилась в течение 14 суток. Затем из лунок удаляли ростовую среду, монослой промывали раствором PBS, фиксировали 1 мл раствора NBF 1 час при комнатной температуре, после чего снова промывали PBS. Затем вносили рабочий раствор (приготовленный согласно инструкции производителя) OilRedO (Sigma, Германия), инкубировали 20 минут при комнатной температуре, краситель удаляли, а клетки промывали PBS. Остеофакторы – 2 мМ L-глутамина, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 10 мкМ дексаметазона и 10 мМ β -глицерофосфата – вносили в соответствующие планшеты через 24 ч. Инкубировали в течение 21 суток. Затем из лунок удаляли ростовую среду, монослой промывали раствором PBS, фиксировали добавлением 1 мл 70 % этилового спирта на 1 ч при комнатной температуре, после чего лунки двукратно промывали водой. Затем добавляли по 300 мкл красителя ализаринового красного, инкубировали 20 минут при комнатной температуре, удаляли краситель и снова промывали водой. Результаты окрашивания оценивали с помощью инвертированного светового микроскопа. В клетках МСК КМ окрашивание выявило интенсивную остеогенную дифференцировку. Для культур, которые не смогли дифференцироваться в заданных направлениях был сделан вывод о необходимости проведения подбора протоколов с другими концентрациями уже использованных факторов дифференцировки, введением дополнительных дифференцирующих факторов, увеличением времени инкубации с адипо- и остеофакторами или использования готовых коммерческих сред.

Таким образом, использованный протокол дифференцировки в адипогенном направлении не вызвал направленной дифференцировки обеих

культур МСК барана, так как клеток, окрашенных красителем OilRedO, не наблюдалось. После проведения остеогенной дифференцировки, в препаратах культуры МСК ЖТ окрашенных клеток не наблюдалось. Анализ клеток на 10-м пассаже показал, что 100 % полученных метафазных пластинок все еще имели диплоидный кариотип 54 XY. Не наблюдалось пластинок с потерями или удвоением отдельных хромосом, а также полиплоидией (Pushkina, V. S. et al., 2025).

Глава 3. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Криоконсервация - процедура заморозки и длительного хранения сперматозоидов в условиях сверхнизких температур (Волкова, Л. А. и Волкова, Н. А., 2025).

Процесс криоконсервации снижает качество спермы из-за различных криоповреждений (ультраструктурные, биохимические и термические), что приводит к изменению уровня фертильности после разморозки (Rizkallah, N. et al., 2022; Пушкина, В. С. и Корочкина, Е. А., 2023).

Во время криоконсервации сперматозоиды подвергаются значительным рискам, включая образование внутриклеточных кристаллов льда, холодовой шок и производство избыточных реактивных форм кислорода. Эти факторы могут нарушить клеточные мембраны, митохондрии и целостность хроматина, что приводит к повреждению ДНК (Mokarizadeh, A. et al., 2013; Айбазов, М. М. и Мамонтова, Т. В., 2020; Корочкина, Е. А. с соавтор., 2023).

Важным аспектом является подбор корректного протокола криоконсервации (Сембаева, А. И. с соавтор., 2022). К примеру, центрифугирование сперматозоидов является распространенной процедурой при обработке эякулята в протоколах вспомогательных репродуктивных технологиях в рамках методов анализа, отбора или сохранения спермы (Корочкина, Е. А., 2025). Тем не менее, данная процедура может привести к большой потере эякулята и вызвать пагубное воздействие на функцию сперматозоидов баранов. По данным Neila-Montero, M. et al., (2022), протокол без негативного воздействия на физиологический статус сперматозоидов ($P > 0,05$) был достигнут при $1200 \times g$, так как $6000 \times g$ индуцировал повреждение подвижной части сперматозоидов ($P \leq 0,05$). Повреждение, нанесенное при $6000 \times g$, сохранялось с течением времени, что совпадало с более низкой фертильностью ($P \leq 0,05$). Соответственно, сперматозоиды можно центрифугировать до $1200 \times g$ в течение 10 минут при температуре 15°C в качестве безопасных значений с высокой скоростью восстановления и без пагубного воздействия на качество спермы. В

нашем исследовании мы использовали более щадящие режимы - 700 об/мин в течение 15 минут, для предотвращения негативного воздействия на структуру половых клеток. Далее удаляли семенную плазму, поскольку исследованиями было выявлено отрицательное воздействие семенной жидкости на подвижность сперматозоидов и их выживаемость после замораживания-оттаивания (Graham, J. K., 1994; Palomo, M. J. et al., 2017). Семенная плазма содержит белки, низкомолекулярные соединения, электролиты, такие как Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и тяжелые металлы, которые могут быть контрпродуктивными и снижать выживаемость сперматозоидов в процессе криоконсервации спермы (Garcia, M. A. и Graham, E. F., 1987; Martí, E. et al., 2006; Белобороденко, А. М. с соавтор., 2015). Влияние плазмы на качество спермы и ее жизнеспособность широко обсуждалось различными авторами (Manjunath, P. et al., 2002; Айбазов, А. М. 2003; Ledesma, A. et al., 2016; Иолчиев, Б. С. с соавтор., 2020; Bartmer, M. et al., 2023).

Было высказано предположение, что удаление семенной жидкости в качестве подготовки к криоконсервации может быть полезным для хранения спермы (L. Höfner et al., 2020; Neila-Montero, M., 2024).

Скорость охлаждения также является одним из важных факторов в процессе криоконсервации спермы, влияя на общую эффективность замораживания. Высота материала над парами азота и время инкубации могут существенно повлиять на скорость охлаждения. Соответствующие скорости охлаждения могут свести к минимуму образование кристаллов льда в сперматозоидах (L. Zhang et al., 2024).

В своих исследованиях мы использовали двухступенчатую заморозку с предварительным охлаждением при температуре $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1,5 часов. Протокол заморозки включал в себя: 1 шаг – 4 см над жидким азотом на 10 минут ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$); 2 шаг – полное погружение в жидкий азот.

Согласно проведенной апробации протокола криоконсервации спермы были получены следующие результаты: статистически значимая разница значений прогрессивности движений сперматозоидов с тенденцией к их

снижению наблюдалась после оттаивания: на 22,6 % - 0 часов после оттаивания ($p \leq 0,01$), на 24,8 % - 1 час после оттаивания ($p \leq 0,05$), на 33,7 % - 2 часа после оттаивания ($p \leq 0,01$). Выбранный протокол криоконсервации обеспечил прогрессивность движений сперматозоидов в течение 2-х и более часов после оттаивания.

Полученные значения показателей спермы баранов после оттаивания указывают на выраженную сезонную особенность криоконсервации спермы баранов, в частности, низкую эффективность глубокого замораживания (апрель-май), и согласуются с результатами исследований Айбазова, А. М. (2022), а также Saha, A. et al. (2022). Впервые были выделены и изучены МСК из костного мозга и жировой ткани. В культуре МСК ЖТ наблюдались клетки с фибробластоподобной морфологией, встречались мелкие округлые клетки, единичные колонии полигональных клеток эпителиоподобной морфологии и единичные большие плоские клетки. В культуре МСК КМ присутствовали, кроме фибробластоподобных клеток, клетки округлой формы. К 4-му пассажу обе культуры стали более однородными, все сторонние клетки элиминировались. Клетки культуры были фибробластоподобными с характерными 2-4 отростками, в зависимости от плотности монослоя в месте наблюдения. Отмечено также, что визуально МСК ЖТ были крупнее МСК КМ. Все различия между культурами нивелировались к 15-му пассажу, когда культуры активно пролиферировали и монослой приобрел большую степень насыщения. При проведении индукции культур МСК в адипогенном и остеогенном направлениях было показано, что МСК, выделенные из разных источников ЖТ и КМ, требовали разное время для дифференцировки в том или ином направлении. Используемые в работе протоколы выделения МСК из разных тканей, культивирования и дифференцировки стабильно позволяют получать популяции МСК как из жировой ткани, так и из костного мозга. Проведенные нами исследования вносят вклад в понимание межвидовых особенностей МСК *in vitro*, а также является основой для планирования практического применения МСК овец в различных сферах. Принимая во

внимание положительный опыт применения МСК в гуманной медицине, главным образом в аспекте их регенеративных свойств, данные клетки могут быть использованы также в ветеринарной медицине. К примеру, применение МСК, полученных из пуповины, жировой ткани и костного мозга, способствовало восстановлению фертильности спермы самцов (Hajihoseini, M. et al., 2017).

Проведенное нами исследование также указывает на выраженный регенеративный эффект при использовании МСК из костного мозга и жировой ткани. Установленное нами увеличение количества морфологически нормальных сперматозоидов с сохранением подвижности было чаще зарегистрировано в опытных группах с МСК, также, как и количество с интактной акросомой, что, вероятно, свидетельствует о влиянии выделяемых веществ клетками. МСК из ЖТ при добавлении в нативный эякулят барана-производителя оказали пролонгированное положительное влияние на двигательную активность сперматозоидов. Увеличение в 1,1 раза числа прогрессивнодвигающихся клеток отмечали через 1 и 2 часа после получения образцов. МСК из костного мозга в количестве 2×10^6 кл/мл сохраняли двигательную активность в течение первого часа после получения спермы. Что касается процесса заморозки-оттаивания, то при добавлении МСК из костного мозга в сперму баранов после криоконсервации наблюдалось увеличение количества нормальных сперматозоидов в 1,1 раза ($p \leq 0,01$) спустя 4 часа инкубации. Кроме того, наибольшее количество нормальных сперматозоидов по окончании шестичасовой инкубации было зафиксировано в первой опытной группе (МСК КМ) и составило $44,2 \pm 2,75$ %. Что касается влияния МСК из ЖТ во время криоконсервации, то на второй и четвертый часы инкубации образцов в готовой среде и МСК ЖТ было зарегистрировано увеличение количества нормальных сперматозоидов ($36,10 \pm 3,75$ % и $36,00 \pm 2,61$ %) и снижение количества сперматозоидов с дефектами головок на четвертый час инкубации по сравнению с данными 0 часов ($34,50 \pm 2,40$ %). В вопросе сохранения целостности акросомы, хороший эффект оказали МСК

КМ, снижение количества всего в 1,1; 1,3 и 1,7 раз ($p < 0.01$). Факторы роста, цитокины, хемокины, компоненты внеклеточного матрикса и продукты метаболизма были признаны функциональными молекулами МСК (Паюшина, О. В., 2006; Лыков, А. П., 2023). Данные секреторные факторы способствуют иммунной модуляции, ремоделированию тканей и клеточному гомеостазу во время регенерации (Y. Han et al., 2022).

Установленный нами регенераторный эффект МСК согласуется с результатами других исследований. Так, было изучено влияние МСК на сперматозоиды кабана и крысы. Результаты исследования показали, что в течение 12 часов инкубации МСК способствовали выживанию сперматозоидов кабана и поддержанию их подвижности на 60-80 % (в зависимости от разбавителя) по сравнению с контролем (E. Zakirova et al., 2023). В другой работе исследовали влияние экзосом МСК при криоконсервации семени кобелей. Результаты показали, что группа с добавлением МСК имела значительно более высокую общую подвижность ($60,31 \pm 6,12$ %), прогрессивную подвижность ($22,09 \pm 3,34$ %), целостность плазматической мембраны ($66,94 \pm 2,24$ %) и жизнеспособность ($70,88 \pm 1,95$ %) по сравнению с другими группами ($P < 0,05$). Кроме того, скорость упаковки хроматина была выше в группе с МСК ($91,33 \pm 0,61$ %, $P < 0,05$) (Tanrikulu, M. D. et al., 2025).

В области андрологии многочисленными исследованиями было установлено положительное влияние МСК на морфофункциональные показатели сперматозоидов. Нами было обнаружено благоприятное влияние МСК в аспекте их восстановительных и регенеративных свойств на структуру клетки (увеличение процента подвижных сперматозоидов с сохранением морфологической целостности). Вместе с тем, механизм влияния внеклеточных и внутриклеточных компонентов МСК остается открытым.

Глава 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

4.1 ВЫВОДЫ

1. Эффективным протоколом криоконсервации спермы баранов-производителей романовской породы является: центрифугирование (режим: 700 об/мин в течение 15 минут), удаление семенной плазмы, разбавление 1:4 OptiXcell, охлаждение при температуре + 4 °С в течение 1,5 часов. Протокол заморозки: 1 шаг – 4 см над жидким азотом на 10 минут (-70 °С); 2 шаг – полное погружение в жидкий азот.

2. Особенности МСК ЖТ является фибробластоподобная морфология, наличие мелких округлых клеток, единичных колоний полигональных клеток эпителиоподобной морфологии и единичных больших плоских клеток. Для МСК КМ характерным является клетки округлой формы разного размера, вероятно адгезивная фракция ГСК (гемопозитические стволовые клетки).

3. Протоколом использования МСК в аспекте улучшения качественных показателей спермы баранов является концентрация МСК (ЖТ, КМ, КР МСК) - 2×10^6 кл/мл и сперматозоидов - 7×10^8 кл/мл.

4. Установлен выраженный регенеративный эффект МСК в качестве компонента разбавителя при криоконсервации: наибольшее количество морфологически нормальных сперматозоидов было зарегистрировано в группе МСК ЖТ в 1,3 (2 и 4 часов, $p \leq 0,05$ и $p < 0,01$) по сравнению с результатами после разбавления образцов спермы; в течение 4-х часов после оттаивания было зафиксировано сокращение количества прогрессивнодвигающихся сперматозоидов – 4,7 раз (МСК КМ, $p < 0,01$) и 3,1 раз (МСК ЖТ, $p < 0,01$) раз, в то время как в контрольной группе в 8,9 раз (4 часа после оттаивания, $p < 0,01$) раз.

5. Был зафиксирован выраженный регенеративный эффект МСК из КМ на функциональную целостность размороженных сперматозоидов, в частности, восстановление двигательной активности и увеличение процента

прогрессивнодвигающихся сперматозоидов на 1,45 % (контрольная группа) и 15,25 % (опытная группа МСК КМ) через 2 часа исследований.

4.2 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Перед проведением процесса замораживания-оттаивания эякулята баранов-производителей необходимо выполнить тщательную подготовку семени, ее оценку, центрифугирование (режим: 700 об/мин в течение 15 минут) с удалением плазмы, разбавление 1:4 OptiXcell (IMV, Франция), охлаждение при температуре + 4 °С в течение 1,5 часов. Протокол заморозки: 1 шаг – 4 см над жидким азотом на 10 минут (-70 °С); 2 шаг – полное погружение в жидкий азот

2. Благодаря регенеративному эффекту МСК рекомендуем использовать в качестве средового компонента разбавителя для криоконсервации, а также в качестве реабилитационной среды без значительной потери морфофункциональных характеристик сперматозоидов баранов-производителей. При этом эффективным протоколом использования МСК и сперматозоидов концентрация МСК (ЖТ, КМ МСК) - 2×10^6 кл/мл и сперматозоидов - 7×10^8 кл/мл.

3. Материалы исследований рекомендуем использовать при проведении научно-исследовательских работ по вопросам предподготовки семени, криоконсервации и использовании при искусственном осеменении овец на различных овцеводческих комплексах, в учебном процессе высших учебных заведений сельскохозяйственного профиля при изучении дисциплины «Акушерство, гинекология и биотехника размножения животных».

4.3 РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективным направлением является масштабирование данных исследований с проведением следующих исследований:

1. Выделение и характеристика линии МСК ЖТ баранов по мезенхимальным маркерам и способности к основным типам дифференцировки;
2. Получение образцов кондиционированной среды МСК ЖТ в нескольких вариантах: полная среда, фракция микровезикул, среда без микровезикул;
3. Получение характеристик белкового состава всех трех вариантов кондиционированной среды МСК ЖТ, что позволит определить потенциальные мишени, участвующие в криопротективном действии секрета МСК ЖТ;
4. Установление влияния фракции микровезикул изолированного секрета МСК ЖТ на морфофункциональные показатели спермы баранов до и после криоконсервации;
5. Получение характеристики белкового состава фракции микровезикул секрета МСК ЖТ баранов;
6. Анализ спектра РНК в составе секрета МСК ЖТ баранов;
7. Апробация искусственного осеменения овец разных пород на площадках по искусственному осеменению.

4.4 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

КМ – костный мозг

ЖТ – жировая ткань

КС – кондиционированная среда

КР – лизат

PBS – фосфатный буферный раствор

FBS – фетальная бычья сыворотка

4.5 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдееenko, В. С. Ветеринарное акушерство с неонатологией и биотехника репродукции животных. Практикум : учебное пособие для вузов / В. С. Авдееenko, С. В. Федотов, С. О. Лощинин. – 2-е издание, стереотипное. – Санкт-Петербург: Лань, 2022. – 196 с.
2. Айбазов, А. М. М. Теоретические основы, разработка и совершенствование биотехнологических методов воспроизводства овец: специальность 06.02.01 "Диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных": диссертация на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук / Айбазов Али-Магомед Муссаевич. – Ставрополь, 2003. – 271 с.
3. Айбазов, А.-М. М. Влияние сезона года на живую массу, размер семенников, уровень тестостерона и качество спермопродукции у баранов мясных пород / А. М. М. Айбазов // Сельскохозяйственный журнал. – 2022. – № 4(15). – С. 66-74.
4. Айбазов, А.-М. М. Теоретические основы, разработка и совершенствование биотехнологических методов воспроизводства овец: автореф. дис. д-ра. сельхоз. наук / Айбазов Али-Магомед Муссаевич. - Ставрополь, 2003. - 52 с
5. Айбазов, М. М. Влияние криопротекторов и технологической обработки на некоторые параметры качества замороженной спермы барана / М. М. Айбазов, Т. В. Мамонтова // Зоотехния. – 2021. – № 6. – С. 33-37.
6. Айбазов, М. М. Качественные показатели спермы барана, криоконсервированной при разных технологиях / М. М. Айбазов, Т. В. Мамонтова // Сельскохозяйственный журнал. – 2020. – № 2(13). – С. 39-46.
7. Айбазов, М. М. Сравнительная характеристика спермы барана, замороженной в разных экстендерах/ М. М. Айбазов, А. Н. Шевченко, М. И. Селионова [и др.] // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2021. – № 4. – С. 63–78.

8. Акушерство, гинекология и биотехника размножения животных: учебное пособие / Габедава М. А., Евстафьев Д. М., Евстафьева Л. В., Воронкова О. А.//. – Калуга: Индивидуальный предприниматель Стрельцов Илья Анатольевич, 2024. – 176 с.

9. Акушерство, гинекология и биотехника репродукции животных : Учебник / А. П. Студенцов, В. С. Шипилов, В. Я. Никитин [и др.] ; Рекомендовано НМС при ФУМО по укрупненной группе специальностей и направлений подготовки высшего образования «Ветеринария и зоотехния» в качестве учебника для студентов вузов, обучающихся по направлению подготовки «Зоотехния». – 10-е издание, стереотипное. – Санкт-Петербург: Издательство "Лань", 2020. – 548 с.

10. Алексеев, К. Д. Мезенхимальные стволовые клетки в регенеративной медицине / К. Д. Алексеев, Н. В. Пименов // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, товароведения и экспертизы сырья и продуктов животного и растительного происхождения, зоотехнии и биотехнологии : материалы X научно-практической конференции в рамках XII Всероссийского фестиваля науки : сборник научных трудов студентов и молодых ученых, Москва, 30 ноября 2022 года / Министерство сельского хозяйства Российской Федерации; ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К. И. Скрябина». – Москва: ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К. И. Скрябина», 2022. – С. 316-318.

11. Багиров, В. А. Влияние криоконсервации на биологические параметры семени баранов / В. А. Багиров, Б. С. Иолчиев, Н. А. Волкова, Н. А. Зиновьева // Проблемы и перспективы развития современной репродуктивной технологии, криобиологии и их роль в интенсификации животноводства : Материалы международной научно-практической конференции, Посвящается 70-летию Открытия № 103 и памяти Л.К. Эрнста (08.01.1929-26.04.2012), п. Дубровицы, 24–27 апреля 2017 года. – п. Дубровицы: Всероссийский научно-

исследовательский институт животноводства имени академика Л. К. Эрнста, 2017.

12. Баймишев, Х. Б. Акушерство и гинекология / Х. Б. Баймишев, М. Х. Баймишев. – Кинель: Самарская государственная сельскохозяйственная академия, 2021. – 400 с.

13. Баймишев, Х. Б. Ветеринарное акушерство, гинекология и биотехника размножения животных: учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальностям 111201 "Ветеринария" и 110400 "Зоотехния" / Х. Б. Баймишев; Х. Б. Баймишев; М-во сельского хоз-ва РФ, ФГОУ ВПО "Самарская гос. с.-х. акад.". – Самара: Ред.-изд. центр Самарской ГСХА, 2008. – 369 с.

14. Биотехника воспроизводства с основами акушерства: Учебник для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направления подготовки 36.03.02 Зоотехния (квалификация (степень) "бакалавр") / А. М. Белобороденко, И. А. Родин, М. А. Белобороденко, Т. А. Белобороденко. – Тюмень: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Государственный аграрный университет Северного Зауралья", 2015. – 554 с.

15. Борунова, С. М. Комплексное исследование биологических показателей спермы баранов романовской породы / С. М. Борунова, О. Э. Бадмаев, А. А. Кочконян // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2020. – № 1. – С. 129-130.

16. Волкова, Л. А. Получение и криоконсервация ранних половых клеток самцов рода *Ovis* / Л. А. Волкова, Н. А. Волкова // Ветеринария и кормление. – 2025. – № 6. – С. 24-29.

17. Гатиатулина, Е. Р. Стромально-васкулярная фракция жировой ткани: механизм действия, перспективы и риски местного применения / Е. Р. Гатиатулина, Н. Е. Мантурова, Г. П. Димов [и др.] // Пластическая хирургия и эстетическая медицина. – 2019. – № 2. – С. 43-48.

18. Гнездилова, Л. А. Митохондриальная дисфункция и активность сперматозоидов баранов романовской породы / Л. А. Гнездилова, С. М. Борунова, А. А. Кочконян // Сборник научных трудов Десятой Всероссийской межвузовской конференции по клинической ветеринарии в формате Purina Partners, Москва, 18 декабря 2020 года. – Москва: НПО «Сельскохозяйственные технологии», 2020. – С. 222-227.

19. Гулевский, А. К. Влияние ДМСО и фракции (до 5 КДА) кордовой крови на ростовые свойства культуры МСК / А. К. Гулевский, А. А. Лаврик, А. В. Трифонова // Вестник проблем биологии и медицины. – 2014. – Т. 3, № 3(112). – С. 96-100.

20. Гуляева, Т. А. Перспективы применения стволовых клеток в ветеринарии / Т. А. Гуляева // Научный журнал молодых ученых. – 2022. – № 4(29). – С. 5-11.

21. Гущин, А. И. Антиоксиданты в ветеринарии / А. И. Гущин, С. Н. Копылов // Знания молодых: наука, практика и инновации: Сборник научных трудов международной научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых, Киров, 01–30 апреля 2014 года. – Киров: Вятская государственная сельскохозяйственная академия, 2014. – С. 152-156.

22. Двалишвили, В. Г. Совершенствование мясной продуктивности овец романовской породы баранами Иль-де-Франс / В. Г. Двалишвили // АгроЗооТехника. – 2022. – Т. 5, № 4.

23. Долганова, О. М. Получение мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани / О. М. Долганова // Инновационная наука. – 2021. – № 11-1. – С. 138-140.

24. Епишина, В. И. Способ повышения оплодотворяющей способности криоконсервированной спермы баранов / В. И. Епишина, Т. М. Епишина // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2008. – № 4. – С. 21-23.

25. Ерохин, А. С. Криозащитное действие новых синтетических антиоксидантов при криоконсервации спермы баранов / А. С. Ерохин, Т. М.

Епишина, А. Г. Никифоров // Сельскохозяйственная биология. – 1996. – Т. 31, № 6. – С. 19-21.

26. Закирова, Е. Ю. Влияние мезенхимных стволовых клеток на сперму животных при хранении / Е. Ю. Закирова, А. Г. Маланьева, А. М. Аймалетдинов // Ветеринария сегодня. – 2023. – Т. 12, № 4. – С. 354-362.

27. Зеленовский, Н. В. Анатомия животных: Практикум: учебное пособие для вузов / Н. В. Зеленовский, М. В. Щипакин, К. Н. Зеленовский. – Издание второе, стереотипное. – Санкт-Петербург: Лань, 2025. – 696 с. – ISBN 978-5-507-52119-7.

28. Ибишов, Д. Ф. Акушерство, гинекология и биотехнология размножения сельскохозяйственных животных / Д. Ф. Ибишов, Л. Н. Ситева. – Пермь: Пермская государственная сельскохозяйственная академия имени академика Д. Н. Прянишникова, 2013. – 69 с.

29. Иванов, И. И. Искусственное оплодотворение у млекопитающих. - СПб, 1907. - С.47-50.

30. Иолчиев, Б. С. Повышение фертильности баранов-производителей с использованием достижений биотехнологии / Б. С. Иолчиев, Н. А. Волкова, П. М. Кленовицкий, В. А. Багиров // Достижения науки и техники АПК. – 2020. – Т. 34, № 2. – С. 48-52.

31. Квачева, З. Б. Сравнительный анализ методов получения культур стволовых клеток эпителия роговицы человека и создание биосовместимого композита со стволовыми клетками / З. Б. Квачева, И. Б. Василевич, А. Ю. Чекина [и др.] // Гены и Клетки. – 2019. – Т. 14, № 4. – С. 29-34.

32. Климович, П. С. Влияние концентрации ДМСО в среде для криоконсервации на выживаемость, пролиферативный потенциал и функциональные характеристики мезенхимных стволовых клеток / П. С. Климович, В. Ю. Сысоева, Д. В. Вайпан [и др.] // Биофармацевтический журнал. – 2018. – Т. 10, № 6. – С. 12-20.

33. Князева, Е. В. Перспективы применения клеточной терапии в ветеринарии / Е. В. Князева, А. Е. Гончаров // Наше сельское хозяйство. – 2023. – № 20(316). – С. 52-57.

34. Корнеев-Жилиева, Л. В. Совершенствование технологии искусственного осеменения овец: специальность 06.02.01 "Диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных": автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Корнеев-Жилиева Лидия Владимировна. – п. Лесные Поляны Московской обл., 2008. – 20 с.

35. Корочкина, Е. А. Влияние кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток баранов на качественные показатели сперматозоидов / Е. А. Корочкина, А. В. Трифонова, А. Ю. Нечаев [и др.] // Международный вестник ветеринарии. – 2024. – № 2. – С. 276-284.

36. Корочкина, Е. А. Влияние лизата мезенхимальных стволовых клеток (МСК) баранов на качественные показатели сперматозоидов / Е. А. Корочкина, А. В. Трифонова, Е. Ю. Финагеев [и др.] // Вестник КрасГАУ. – 2024. – № 12(213). – С. 94-100.

37. Корочкина, Е. А. Влияние мезенхимальных стромальных клеток на качество спермы баранов после криоконсервации / Е. А. Корочкина, В. С. Пушкина // Ветеринария и кормление. – 2024. – № 4. – С. 55-59.

38. Корочкина, Е. А. Влияние МСК из жировой ткани и костного мозга баранов на качественные показатели их / Е. А. Корочкина, Е. Ю. Финагеев, Д. Е. Главацкая [и др.] // Ветеринария. – 2024. – № 1. – С. 37-41.

39. Корочкина, Е. А. Использование мезенхимальных стромальных клеток при криоконсервации спермы баранов-производителей / Е. А. Корочкина, Е. Ю. Финагеев, В. С. Пушкина [и др.] // Ветеринария. – 2024. – № 11. – С. 43-47.

40. Корочкина, Е. А. Качество спермы баранов до и после криоконсервации / Е. А. Корочкина, Е. Ю. Финагеев, Д. Е. Главацкая, В. С. Пушкина // Ветеринария. – 2023. – № 8. – С. 34-38.

41. Корочкина, Е. А. Сравнительный анализ эффективности протоколов центрифугирования для предварительной обработки спермы производителей / Е. А. Корочкина // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. – 2025. – № 3. – С. 48-54.

42. Куаншкалиев, Э. Ю. Влияние криоконсервации на качество семени баранов-производителей / Э. Ю. Куаншкалиев, А. В. Убушиева, А. А. Эрендженова, Д. С. Вудвуд // Новые горизонты студенческой науки в условиях глобализации: Материалы II Межрегиональной научно-практической конференции, Элиста, 22 апреля 2022 года / Редколлегия: О.Н. Кониева [и др.]. – Элиста: Калмыцкий государственный университет имени Б.Б. Городовикова, 2022. – С. 936-939.

43. Кудинова, С. П. Применение антиоксидантов в ветеринарии / С. П. Кудинова // Современные научные исследования: исторический опыт и инновации: сборник материалов Международной научно-практической конференции, Краснодар, 26–27 февраля 2015 года / ответственный редактор И.А.Харитонов. Том Часть 2. – Краснодар: Академия маркетинга и социально-информационных технологий - ИМСИТ (г. Краснодар), 2015. – С. 70-73.

44. Кустов, В. В. Искусственное осеменение и перспективы развития ветеринарии / В. В. Кустов, Л. Г. Войтенко, Ю. С. Гнидина // Актуальные вопросы развития отраслей сельского хозяйства в условиях цифровизации : Сборник научных трудов по материалам III Всероссийской (с международным участием) научно-практической конференции, Махачкала, 13 ноября 2024 года. – Махачкала: ООО "Издательство АЛЕФ", 2024. – С. 375-382.

45. Лаврик, А. А. Регенеративная медицина - будущее ветеринарии / А. А. Лаврик, Г. В. Анненкова, С. Г. Дресвянникова [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2021. – № 1. – С. 33-36.

46. Лыков, А. П. Мезенхимные стволовые клетки: свойства и клиническое применение / А. П. Лыков // Сибирский научный медицинский журнал. – 2023. – Т. 43, № 2. – С. 40-53.

47. Маклакова, И. Ю. Методика получения моноклеарной фракции клеток из плаценты лабораторных животных / И. Ю. Маклакова, А. П. Ястребов, А. В. Осипенко // Научный альманах. – 2015. – № 7(9). – С. 878-879.

48. Мамонтова, Т. В. Оплодотворяющая способность спермы баранов разного срока хранения / Т. В. Мамонтова, М. М. Айбазов // Сборник научных трудов Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. – 2017. – Т. 1, № 10. – С. 186-190.

49. Медведев, Г. Ф. Акушерство, гинекология и биотехнология размножения сельскохозяйственных животных: практикум / Г. Ф. Медведев, К. Д. Валюшкин. – Минск: Беларусь, 2010. – 456 с.

50. Милованов, В. К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных / Милованов В.К. - М.: Колос, 1962. - 781 с.

51. Монгуш, Ч. А. Мясные и убойные качества баранины / Ч. А. Монгуш // Современное состояние животноводства: проблемы и пути их решения: Материалы Международной научно-практической конференции, Саратов, 21–23 марта 2018 года. – Саратов: ООО «Орион», 2018. – С. 135-136.

52. Назаров, М. В. Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных: Учебное издание / М. В. Назаров, Е. А. Горпинченко, Б. В. Гаврилов; Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина. – Краснодар: Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, 2018. – 138 с.

53. Нежданов, А. Г. Воспроизводство высокопродуктивного молочного скота: эффективность ветеринарного контроля / А. Г. Нежданов, К. А. Лободин // Молочная промышленность. – 2015. – № 11. – С. 64-65.

54. Озтерклер, Й. Краткий обзор современных добавок к разбавителям спермы, применяемых для повышения устойчивости семени баранов к замораживанию / Й. Озтерклер, У. Ц. Ари // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т. 52, № 2. – С. 242-250.

55. Осипова, Н. И. Стволовые клетки животных: история и перспективы / Н. И. Осипова // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2006. – № 1. – С. 50.

56. Павлов, В. Н. Стромально-васкулярная фракция: биология и потенциальное применение / В. Н. Павлов, А. А. Казихинулов, Р. А. Казихинулов [и др.] // Креативная хирургия и онкология. – 2021. – Т. 11, № 1. – С. 92-99.

57. Павлов, С. А. Культивирование клеток, как перспективный метод в биотехнологии / С. А. Павлов, К. И. Данилова // Научные исследования студентов в решении актуальных проблем АПК: Материалы всероссийской студенческой научно-практической конференции. В IV томах, Иркутск, 17–18 февраля 2022 года. – п. Молодежный: Иркутский государственный аграрный университет им. А.А. Ежевского, 2022. – С. 117-122.

58. Паюшина, О. В. Мезенхимные стволовые клетки: источники, фенотип и потенции к дифференцировке / О. В. Паюшина, Е. И. Домарацкая, В. И. Старостин // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2006. – № 1. – С. 6-25.

59. Пинчук, С. В. Кримоконсервация стволовых клеток: практические аспекты и преимущества / С. В. Пинчук, Л. В. Дубовская, Г. М. Загородный, И. Д. Волоотовский // Прикладная спортивная наука. – 2017. – № 1(5). – С. 105-112.

60. Племяшов, К. В. Разведение, селекция, генетика и биотехнология животных: методические указания для самостоятельной работы аспирантов / К. В. Племяшов, П. И. Уколов, Г. С. Никитин. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2024. – 49 с.

61. Повещенко, О. В. Способы выделения и условия культивирования мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека, полученной из различных источников / О. В. Повещенко, А. П. Колесников, И. И. Ким [и др.] // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2008. – Т. 28, № 5. – С. 90-95.

62. Потапнев, М. П. Пути повышения эффективности клеточной терапии на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / М. П. Потапнев // Гены и Клетки. – 2021. – Т. 16, № 4. – С. 22-28.

63. Пушкина, В. С. Сравнительная характеристика протоколов криоконсервации спермы баранов-производителей / В. С. Пушкина, Е. А. Корочкина // Генетика и разведение животных. – 2023. – № 3. – С. 94-102.

64. Радаева, И. Ф. Культивирование клеток на микроносителях в биореакторах / И. Ф. Радаева, Н. Б. Думченко, Е. А. Нечаева // Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Химическая технология и биотехнология. – 2019. – № 2. – С. 22-32.

65. Сабурина, И. Н. Перспективы и проблемы применения культур клеток для регенеративной медицины / И. Н. Сабурина, Т. Д. Колокольцова, В. С. Репин, А. А. Кубатиев // Патогенез. – 2015. – Т. 13, № 1. – С. 60-73.

66. Савченкова, И. П. Перспективы использования стволовых клеток в ветеринарии / И. П. Савченкова, М. И. Гулюкин // Ветеринария. – 2011. – № 7. – С. 3-5.

67. Сембаева, А. И. Методы криоконсервации спермы баранов-производителей мясного направления / А. И. Сембаева, Т. Д. Чортонбаев, А. Бектуров // Вестник Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина. – 2022. – № 4(63). – С. 200-209.

68. Семченко, В. В. Регенеративная биология и медицина. Генные технологии и клонирование / В. В. Семченко, С. И. Ерениев, С. С. Степанов. – Второе издание, исправленное и дополненное. – Москва: ООО «Директ-Медиа», 2024. – 324 с.

69. Сергеев М.А., Амиров Д.Р., Тимофеева А.В. Выделение и культивирование мезенхимных стволовых клеток (МСК), полученных из жировой ткани и зубов свиней. Международный вестник ветеринарии. 2021;(1):258-262.

70. Таюрский, М. С. Использование стволовых клеток в ветеринарии / М. С. Таюрский, Н. В. Мантатова // Инновационные достижения ветеринарной науки и практики : Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию доктора ветеринарных наук,

профессора, заслуженного деятеля науки Российской Федерации Тарнуева Юрия Абогоевича, Улан-Удэ, 14–16 июля 2024 года. – Улан-Удэ: Бурятская государственная сельскохозяйственная академия им. В.Р. Филиппова, 2024. – С. 74-78.

71. Физиология животных: практикум / Л. Ю. Карпенко, Н. А. Панова, А. Б. Балыкина, О. А. Душенина; Л.Ю. Карпенко, Н.А. Панова, А.Б. Балыкина, О.А. Душенина. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2023. – 115 с. – EDN CMSNLO.

72. Филатов, А. В. Многоплодие высокопродуктивных свиноматок и пути повышения показателей воспроизводства / А. В. Филатов, А. В. Минин // Зоотехническая наука в условиях современных вызовов: Сборник трудов IV научно-практической конференции с международным участием, Киров, 30 ноября 2022 года. – Киров: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Вятский государственный агротехнологический университет, 2022. – С. 141-144.

73. Фириченков, В. Е. Закономерности изменения эффективности производства продукции овцеводства / В. Е. Фириченков, Ю. А. Мирзоянц, А. Н. Русаков // Вестник Всероссийского научно-исследовательского института механизации животноводства. – 2016. – № 2(22). – С. 178-185.

74. Шаманская, Т. В. Культивирование мезенхимальных стволовых клеток *ex vivo* в различных питательных средах (обзор литературы и собственный опыт) / Т. В. Шаманская, Е. Ю. Осипова, Б. Б. Пурбуева [и др.] // Онкогематология. – 2010. – Т. 5, № 3. – С. 65-71.

75. Шафигуллина, С. Д. Стволовые клетки: виды и применение в ветеринарии / С. Д. Шафигуллина // Теоретические и прикладные основы ветеринарной науки: Сборник трудов научно-практической конференции студентов института ветеринарной медицины и биотехнологии Новосибирского ГАУ, Новосибирск, 27 мая 2025 года. – Новосибирск: ИЦ НГАУ "Золотой колос", 2025. – С. 394-397.

76. Юлдашбаев, Ю. А. Оплодотворяющая способность спермы баранов / Ю. А. Юлдашбаев, В. И. Косилов, Е. А. Никонова [и др.] // Аграрная наука. – 2021. – № 3. – С. 34-37.

77. Яхьяев, Г. У. Некоторые показатели развитие овцеводства регионов России / Г. У. Яхьяев // Теоретические и практические проблемы развития современной науки: сборник материалов IX Международной научно-практической конференции, Махачкала, 29 ноября 2015 года. – Махачкала: Общество с ограниченной ответственностью "Апробация", 2015. – С. 101-104.

78. Ahmad, N. Seasonal variations in the semen quality of young British goats / N. Ahmad, D. E. Noakes // The British veterinary journal. – 1996. – Vol. 152, No. 2. – P. 225–236.

79. Alcaay, S. Effects of low molecular weight cryoprotectants on the post-thaw ram sperm quality and fertilizing ability / S. Alcaay, B. Ustuner, Z. Nur // Small Ruminant Research. – 2016. – Vol. 136. – P. 59-64.

80. Allsopp, R. C. Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation / R. C. Allsopp, G. B. Morin, R. DePinho [et al.] // Blood. – 2003. – Vol. 102, No. 2. – P. 517–520.

81. Anel, L. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen / L. Anel, P. de Paz, M. Alvarez [et al.] // Theriogenology. – 2003. – Vol. 60, No. 7. – P. 1293–1308.

82. Arnhold, S. J. Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells / S. J. Arnhold, I. Goletz, H. Klein [et al.] // American journal of veterinary research. – 2007. – Vol. 68, No.10. – P. 1095–1105.

83. Ashrafi, I. Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa / I. Ashrafi, H. Kohram, H. Najjian [et al.] // BMC Research Notes. – 2011. – Vol. 4, No. 1. – P. 1-6.

84. Awad, M. M. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa / M. M. Awad // Animal Reproduction Science. – 2011. – Vol. 123, Iss. 3-4. – P. 157–162.

85. Azizunnesa, A. Effects of Proportion of Egg Yolk and Preservation Time on Chilled Semen from Indigenous Rams / A. Azizunnesa, Z. Begum, B. Farida [et al.] // *Journal of Veterinary Science*. – 2014. – P. 19-26.

86. Bartmer, M. Sperm Cell Capacitation Status of Ram Semen after Cooling / M. Bartmer, E. Sanguinet, C. Pinzón-Osorio [et al.] // *Acta Scientiae Veterinariae*. – 2023.

87. Baxter, M. A. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion / M. A. Baxter, R. F. Wynn, S. N. Jowitt [et al.] // *Stem Cells*. – 2004. – Vol. 22, No. 5. – P. 675-682.

88. Berean, D.I. Advancements in understanding and enhancing antioxidant-mediated sperm cryopreservation in small ruminants: challenges and perspectives / D. I. Berean, L. M. Bogdan, R. Cimpean // *Antioxidants*. – 2024. – Vol. 13. – P. 624.

89. Berner, A. Autologous vs. allogenic mesenchymal progenitor cells for the reconstruction of critical sized segmental tibial bone defects in aged sheep / A. Berner, J. C. Reichert, M. A. Woodruff [et al.] // *Acta biomaterialia*. – 2013. – Vol. 9, No. 8. – P. 7874–7884.

90. Bieback, K. Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures / K. Bieback // *Transfusion medicine and hemotherapy*. – 2013. – Vol. 40, No. 5. – P. 326–335.

91. Bieback, K. Clinical Protocols for the Isolation and Expansion of Mesenchymal Stromal Cells / K. Bieback, K. Schallmoser, H. Klüter [et al.] // *Transfusion medicine and hemotherapy: offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*. – 2008. – Vol. 35, No.4. – P. 286–294.

92. Bottagisio, M. Osteogenic differentiation of human and ovine bone marrow stromal cells in response to β -glycerophosphate and monosodium phosphate / M. Bottagisio, A. B. Lovati, S. Lopa [et al.] // *Cellular reprogramming*. – 2015. – Vol. 17, No. 4. – P. 235–242.

93. Bravo, J.A. Influence of season and reproductive management on the morphometry of ram sperm head / J.A. Bravo, J. Montanero, R. Calero [et al.] // Small Ruminant Research. – 2014. – P. 119.

94. Bronzini, I. Influence of temperature, time and different media on mesenchymal stromal cells shipped for clinical application / I. Bronzini, M. Patruno, I. Iacopetti [et al.] // Veterinary journal. – 2012. – Vol. 194, No. 1. – P. 121–123.

95. Can, A. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells / A. Can, S. Karahuseyinoglu // Stem cells. – 2007. – Vol. 25, No. 11. – P. 2886–2895.

96. Caplan, A. I. MSCs as therapeutics / A. I. Caplan, P. Hematti, A. Keating // Stem cell biology and Reg medicine: Mesenchymal stromal cells: biology and clinical applications. – 2012. P. 79–90

97. Cardoso, M. T. Characterization of teratogenic potential and gene expression in canine and feline amniotic membrane-derived stem cells / M. T. Cardoso, A. O. Pinheiro, A. S. Vidane [et al.] // Reproduction in Domestic Animals. – 2017. – Vol. 52. – P. 58–64.

98. Carrade, D. D. Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells / D. D. Carrade, M. W. Lame, M. S. Kent [et al.] // Cell medicine. – 2012. – Vol. 4, No. 1. – P. 1–11.

99. Cesarz, Z. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells / Z. Cesarz, K. Tamama // Stem cells international. – 2016, No. 5. – P. 11.

100. Chavakis, E. High-mobility group box 1 activates integrin-dependent homing of endothelial progenitor cells / E. Chavakis, A. Hain, M. Vinci [et al.] // Circulation research. – 2007. – Vol. 100, No. 2. – P. 204–212.

101. Chaveiro, A. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports / A. Chaveiro, L. Machado, A. Frijters [et al.] // Theriogenology. – 2006. – Vol. 65, No. 9. – P. 1875–1890.

102. Chianese, R. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) Production Alters Sperm Quality / R. Chianese, R. Pierantoni // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10, No. 1. – P. 92.
103. Clark, K. C. Canine and Equine Mesenchymal Stem Cells Grown in Serum Free Media Have Altered Immunophenotype / K. C. Clark, A. Kol, S. Shahbenderian [et al.] // *Stem cell reviews and reports*. – 2016. – Vol. 12, No. 2. – P. 245–256.
104. Colleoni, S. Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells / S. Colleoni, G. Donofrio, I. Lagutina [et al.] // *Cloning and stem cells*. – 2005. – Vol. 7, No. 3. – P. 154–166.
105. Colleoni, S. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor / S. Colleoni, E. Bottani, I. Tessaro [et al.] // *Veterinary research communications*. – 2009. – Vol. 33, No. 8. – P. 811–821.
106. da Silva, C.G. Isolation and characterization of Mesenchymal stem cells derived from bovine Wharton's jelly and their potential use in cloning by nuclear transfer / C.G. da Silva, C.F. Martins, T.C. Cardoso [et al.] // *Ciencia Rural*. – 2016. – Vol. 46, No. 10. – P. 1830–1837.
107. Diego, A. Galarza Two-step accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols / A. Galarza Diego, A. Lopez-Sebastian, H. Woelders [et al.] // *Cryobiology*. – 2019. – Vol. 91. – P. 84–89.
108. Drela, K. Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner / K. Drela, A. Sarnowska, P. Siedlecka [et al.] // *Cytotherapy*. – 2014. – Vol. 16, No. 7. – P. 881-892.

109. Duan, W. Effects of Cryopreservation on Canine Multipotent Stromal Cells from Subcutaneous and Infrapatellar Adipose Tissue / W. Duan, M. J. Lopez // Stem cell reviews and reports. – 2016. – Vol. 12, No. 2. – P. 257–268.
110. Eidan, S. M. Effect on post-cryopreserved semen characteristics of Holstein bulls of adding combinations of vitamin C and either catalase or reduced glutathione to Tris extender / S. M. Eidan // Animal reproduction science. – 2016. – Vol. 167. – P. 1–7.
111. Enciso, N. Stem cell factor supports migration in canine mesenchymal stem cells / N. Enciso, L. L. K. Ostronoff, G. Mejías [et al.] // Veterinary research communications. – 2018. – Vol. 42, No. 1. – P. 29–38.
112. Espina, M. Evaluation of transport conditions for autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for therapeutic application in horses / M. Espina, H. Julke, W. Brehm [et al.] // Peer J. – 2016. – Vol. 4.
113. Forouzanfar, M. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen / M. Forouzanfar, M. Sharafi, S. M. Hosseini [et al.] // Theriogenology. – 2010. – Vol. 73, No. 4. – P. 480–487.
114. Fotia, C. Hypoxia enhances proliferation and stemness of human adipose-derived mesenchymal stem cells / C. Fotia, A. Massa, F. Boriani [et al.] // Cytotechnology. – 2015. – Vol. 67, No. 6. – P. 1073–1084.
115. Fowler, A. Cryo-injury and biopreservation / A. Fowler, M. Toner // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2005. – Vol. 1066. – P. 119–135.
116. Fry, L. J. Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation / L. J. Fry, S. Querol, S. G. Gomez [et al.] // Vox sanguinis. – 2015. – Vol. 109, No. 2. – P. 181–190.
117. Fuchs, E. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche / E. Fuchs, T. Tumbar, G. Guasch // Cell. – 2004. – Vol. 116, No. 6. – P. 769–778.

118. Fukui, Y. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep / Y. Fukui, H. Kohno, T. Togari [et al.] // The Journal of reproduction and development. – 2008. – Vol. 54, No. 4. – P. 286–289.
119. Fuller, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state / B. J. Fuller // Cryo letters. – 2004. – Vol. 25, No. 6. – P. 375–388.
120. Gao, D. Mechanisms of cryoinjury in living cells / D. Gao, J. K. Critser // ILAR journalю – 2000. – Vol. 41, No. 4. – P. 187–196.
121. Garcia M. A. Effects of low-molecular-weight fractions (LMWF) from milk, egg yolk, and seminal plasma on freezability of bovine spermatozoa / M. A. Garcia, E. F. Graham // Cryobiology. – 1987. – Vol. 24, No. 5. – P. 429–436.
122. Garvican, E. R. Viability of equine mesenchymal stem cells during transport and implantation / E. R. Garvican, S. Cree, L. Bull [et al.] // Stem cell research and therapy. – 2014. – Vol. 5, No. 4. – P. 94.
123. Ghasemzadeh-Hasankolaei, M. Induction of ram bone marrow mesenchymal stem cells into germ cell lineage using transforming growth factor- β superfamily growth factors / M. Ghasemzadeh-Hasankolaei, M. A. Sedighi-Gilani, M. B. Eslaminejad // Reproduction in domestic animals. – 2014. – Vol. 49, No. 4. – P. 588–598.
124. Gil, J. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen / J. Gil, N. Lundeheim, L. Soderquist [et al.] // Theriogenology. – 2003. – Vol. 59, Iss. 5-6. – P. 1241–1255.
125. Glynn, E. R. Culture conditions for equine bone marrow mesenchymal stem cells and expression of key transcription factors during their differentiation into osteoblasts / E. R. Glynn, A. S. Londono, S. A. Zinn [et al.] // Journal of animal science and biotechnology. – 2013. – Vol. 4, No. 1. – P. 40.
126. Graham, J. K. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process / J. K. Graham // Theriogenology. – 1994. – Vol. 41, No. 5. – P. 1151–1162.

127. Greenwood, M. J. Telomeres, telomerase, and hematopoietic stem cell biology / M. J. Greenwood, P. M. Lansdorp // Archives of medical research. – 2003. – Vol. 34, No. 6. – P. 489–495.
128. Guest, D. J. Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon / D. J. Guest, M. R. Smith, W. R. Allen // Equine Vet J. – 2010. – Vol. 42, No. 7. – P. 636-642.
129. Gugjoo, M. B. Cartilage tissue engineering: Role of mesenchymal stem cells along with growth factors and scaffolds / M. B. Gugjoo, Amarpal, G. T. Sharma [et al.] // The Indian journal of medical research. – 2016. – Vol. 144, No. 3. – P. 339–347.
130. Gugjoo, M. B. Equine Mesenchymal Stem Cells: Properties, Sources, Characterization, and Potential Therapeutic Applications / M. B. Gugjoo, Amarpal, D. M. Makhdoomi [et al.] // Equine Veterinary Science – 2019. – Vol. 72. – P. 16-27.
131. Gugjoo, M. B. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immuno-Modulatory and Anti- Inflammatory Mechanisms in Immune and Allergic Disorders / M. B. Gugjoo, S. Hussain, R. A. Amarpal Shah [et al.] // Recent patents on inflammation and allergy drug discovery. – 2020. – Vol. 14, No. 1. – P. 3–14.
132. Haider, H. K.h. IGF-1-overexpressing mesenchymal stem cells accelerate bone marrow stem cell mobilization via paracrine activation of SDF-1alpha/CXCR4 signaling to promote myocardial repair / H. K.h. Haider, S. Jiang, N. M. Idris [et al.] // Circulation research. – 2008. – Vol. 103, No. 11. – P. 1300–1308.
133. Hajihoseini, M. Induction of spermatogenesis after stem cell therapy of azoospermic guinea pigs / M. Hajihoseini, A. Vahdati, E. Hosseini [et al.] // Veterinarski Arhiv. – 2017. – Vol. 87. – P. 333-350.
134. Han, J. Molecular and functional effects of organismal ageing on smooth muscle cells derived from bone marrow mesenchymal stem cells / J. Han, J. Y. Liu, D. D. Swartz [et al.] // Cardiovascular research. – 2010. – Vol. 87, No. 1. – P. 147–155.

135. Han, Y. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases / Y. Han, J. Yang, J. Fang [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2022. – Vol. 7.
136. He, S. Mechanisms of stem cell self-renewal / S. He, D. Nakada, S. J. Morrison // *Annual review of cell and developmental biology*. – 2009. – Vol. 25. – P. 377–406.
137. Hendijani, F. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues / F. Hendijani // *Cell proliferation*. – 2017. – Vol. 50, No. 2.
138. Hepsibha, P. Multipotent differentiation potential of buffalo adipose tissue derived mesenchymal stem cells / P. Hepsibha, T. V. Meenambigai, A. Mangalagowri [et al.] // *Asian Journal of Animal Veterinary Advances*. – 2011. – Vol. 6. – P. 772–788.
139. Hilkens, P. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells / P. Hilkens, P. Gervois, Y. Fanton [et al.] // *Cell and tissue research*. – 2013. – Vol. 353, No. 1. – P. 65–78.
140. Höfner, L. The role of seminal plasma in the liquid storage of spermatozoa / L. Höfner, A. M. Luther, D. Waberski // *Animal reproduction science*. – 2020. – Vol. 220.
141. Hopper, N. Peripheral Blood Mononuclear Cells Enhance Cartilage Repair in in vivo Osteochondral Defect Model / N. Hopper, J. Wardale, R. Brooks [et al.] // *PloS one*. – 2015. – Vol. 10, No. 8.
142. Hristov, M. Progenitor cell trafficking in the vascular wall / M. Hristov, C. Weber // *Journal of thrombosis and haemostasis*. – 2009. – P. 31–34.
143. Hu, X. Severe hypoxia exerts parallel and cell-specific regulation of gene expression and alternative splicing in human mesenchymal stem cells / X. Hu, R. Wu, L. A. Shehadeh [et al.] // *BMC Genomics*. – 2014. – Vol. 15, No. 1. – P. 303.
144. Hu, Y. Basic fibroblast growth factor lentiviral vector-transfected sheep bone marrow mesenchymal stem cells and non-specific osteogenic gene expression

/ Y. Hu, Q. Zhang, L. Zhang [et al.] // Molecular medicine reports. – 2015. – Vol. 12, No. 1. – P. 267–272.

145. Ji, M. Biological characterization of sheep kidney-derived mesenchymal stem cells / M. Ji, C. Bai, L. Li [et al.] // Experimental and therapeutic medicine. – 2016. – Vol. 12, No. 6. – P. 3963–3971.

146. Jing, W. Explant culture: an efficient method to isolate adipose-derived stromal cells for tissue engineering / W. Jing, J. Xiao, Z. Xiong [et al.] // Artificial organs. – 2011. – Vol. 35, No. 2. – P. 105–112.

147. Junior, A. M. Neurotoxicity associated with dimethylsulfoxide-preserved hematopoietic progenitor cell infusion / A. M. Junior, C. A. Arrais, R. Saboya [et al.] // Bone marrow transplantation. – 2008. – Vol. 41, No. 1. – P. 95–96.

148. Kameni, S.L. Liquid Storage of Ram Semen: Associated Damages and Improvement / S.L. Kameni, F. Meutchieye, F. Ngoula // Open Journal of Animal Sciences. – 2021. – Vol. 11. – P. 473–500.

149. Keskin, N. Cryopreservation Effects on Ram Sperm Ultrastructure / N. Keskin, C. Erdogan, M. N. Bucak [et al.] // Biopreservation and biobanking. – 2020. – Vol. 18, No. 5. – P. 441–448.

150. Kim, H. S. Immunomodulatory effect of canine periodontal ligament stem cells on allogenic and xenogenic peripheral blood mononuclear cells / H. S. Kim, K. H. Kim, Y. S. Kim [et al.] // Journal of periodontal and implant science. – 2010. – Vol. 40, No. 6. – P. 265–270.

151. Kimberling, C. V. Breeding Soundness Evaluation and Surgical Sterilization of the Ram / C. V. Kimberling, G. A. Parsons // Current therapy in large animal theriogenology. – 2007. – P. 620–628.

152. Kode, J. A. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration / J. A. Kode, S. Mukherjee, M. V. Joglekar [et al.] // Cytotherapy. – 2009. – Vol. 11, No. 4. – P. 377–391.

153. Korochkina, E. A. Comparative in vitro characterization of adipose tissue and bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) from sheep and goats for potential applications in stem cell therapy and improved reproduction / E. A.

Korochkina, A. V. Trifonova, I. S. Stafeev [et al.] // German Journal of Veterinary Research. – 2025. – Vol. 5, No. 4. – P. 26-41.

154. Krampera, M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair / M. Krampera, G. Pizzolo, G. Aprili [et al.] // Bone. – 2006. – Vol. 39, No. 4. – P. 678–683.

155. Kriston-Pál, É. Characterization and therapeutic application of canine adipose mesenchymal stem cells to treat elbow osteoarthritis / É. Kriston-Pál, Á. Czibula, Z. Gyuris [et al.] // Canadian journal of veterinary research. – 2017. – Vol. 81, No. 1. – P. 73–78.

156. Kubo, H. Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone marrow by immunohistochemistry / H. Kubo, M. Shimizu, Y. Taya [et al.] // Genes Cells. – 2009. – Vol. 14, No. 3. – P. 407-424.

157. Kumar, D. Effect of post-thaw incubation on semen characteristics of ram spermatozoa cryopreserved under controlled and uncontrolled rate of cooling / D. Kumar, A. Joshi, S.M.K. Naqvi // Anim. Reprod. – 2009. – Vol. 6, No. 4. – P. 526–534.

158. Ledesma, A. Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm / A. Ledesma, E. Fernández-Alegre, A. Cano [et al.] // Animal reproduction science. – 2016. – Vol. 173. – P. 35–41.

159. Ley, K. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated / K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky [et al.] // Nature reviews. Immunology. – 2007. – Vol. 7, No. 9. – P. 678–689.

160. Li, L. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters / L. Li, W. B. Neaves // Cancer research. – 2006. – Vol. 66, No. 9. – P. 4553–4557.

161. Li, P. Z. Overexpression of STRA8, BOULE, and DAZL Genes Promotes Goat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells In Vitro Transdifferentiation Toward Putative Male Germ Cells / P. Z. Li, G. Y. Yan, L. Han [et al.] // Reproductive sciences. – 2017. – Vol. 24, No. 2. – P. 300–312.

162. Li, T. Effect of accutase or trypsin dissociation on the apoptosis of human striatum-derived neural stem cells / T. Li, C. Li, C. Y. Zhang [et al.] // *Acta Academiae Medicinae Sinicae*. – 2015. – Vol. 37, No. 2. – P. 185–194.
163. Lilly, A. J. The haematopoietic stem cell niche: new insights into the mechanisms regulating haematopoietic stem cell behaviour / A. J. Lilly, W. E. Johnson, C. M. Bunce // *Stem cells international*. – 2011.
164. Liu, T. M. Molecular basis of immortalization of human mesenchymal stem cells by combination of p53 knockdown and human telomerase reverse transcriptase overexpression / T. M. Liu, W. M. Ng, H. S. Tan [et al.] // *Stem cells and development*. – 2013. – Vol. 22, No. 2. – P. 268–278.
165. Liu, Y. Cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced dimethylsulfoxide and well-defined freezing solutions / Y. Liu, X. Xu, X. Ma [et al.] // *Biotechnology progress*. – 2010. – Vol. 26, No. 6. – P. 1635–1643.
166. Liu, Z. J. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells / Z. J. Liu, Y. Zhuge, O. C. Velazquez // *Journal of cellular biochemistry*. – 2009. – Vol. 106, No. 6. – P. 984–991.
167. Lu, T. Isolation and characterization of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) from cattle / T. Lu, H. Xiong, K. Wang [et al.] // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2014. – Vol. 174, No. 2. – P. 719–728.
168. Lu, T. Multi-lineage potential research of bone marrow-derived stromal cells (BMSCs) from cattle / T. Lu, Y. Huang, H. Wang [et al.] // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2014. – Vol. 172, No. 1. – P. 21–35.
169. Luster, A. D. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets / A. D. Luster, R. Alon, U. H. von Andrian // *Nature immunology*. – 2005. – Vol. 6, No. 12. – P. 1182–1190.
170. Mackenzie, T. C. Human mesenchymal stem cells persist, demonstrate site-specific multipotential differentiation, and are present in sites of wound healing and tissue regeneration after transplantation into fetal sheep / T. C. Mackenzie, A.

W. Flake // Blood cells, molecules and diseases. – 2001. – Vol. 27, No. 3. – P. 601–604.

171. Makki Khalaf Hussein, A.L. Dulaimi Results regarding some morphometric features of spermatozoa in ram / A.L. Dulaimi Makki Khalaf Hussein, D. Tapaloaga, P. R. Tapaloaga // Agriculture and Agricultural Science Procedia. – 2015. – Vol. 6. – P. 232-235.

172. Manjunath, P. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation / P. Manjunath, I. Thérien // Journal of reproductive immunology. – 2002. – Vol. 53, Iss. 1-2. – P. 109–119.

173. Manual of Animal Andrology / Peter J. Chenoweth, Steven P. Lorton // CABI. – 2021. – P. 113–114.

174. Mareddy, S. Stem cell-related gene expression in clonal populations of mesenchymal stromal cells from bone marrow / S. Mareddy, N. Dhaliwal, R. Crawford [et al.] // Tissue Engineering Part A. – 2010. Vol. 16, No. 2. – P. 749-758.

175. Martí, E. Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa / E. Martí, R. Pérez-Pé, T. Muñoz-Blanco [et al.] // Journal of andrology. – 2006. – Vol. 27, No. 6. – P. 746–753.

176. Martin, Y. Microcarriers and their potential in tissue regeneration / Y. Martin, M. Eldardiri, D. J. Lawrence-Watt [et al.] // Tissue engineering. Part B, Reviews. – 2011. – Vol. 17, No. 1. – P. 71–80.

177. Martinello, T. Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood / T. Martinello, I. Bronzini, L. Maccatrozzo [et al.] // Tissue engineering. Part C, Methods. – 2010. – Vol. 16, No. 4. – P. 771–781.

178. Marx, C. Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications / C. Marx, M. D. Silveira, N. Beyer Nardi // Stem cells and development. – 2015. – Vol. 24, No. 7. – P. 803–813.

179. McCarty, R. C. Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells / R. C. McCarty, S. Gronthos, A. C.

Zannettino [et al.] // Journal of cellular physiology. – 2009. – Vol. 219, No. 2. – P. 324–333.

180. McDuffee, L. A. Osteoprogenitor cell therapy in an equine fracture model / L. A. McDuffee, L. Pack, M. Lores [et al.] // Veterinary Surgery. – 2012. – Vol. 41, No. 7. – P. 773-783.

181. Medeiros, C. M. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? / C. M. Medeiros, F. Forell, A. T. Oliveira [et al.] // Theriogenology. – 2002. – Vol. 57, No. 1. – P. 327–344.

182. Menicanin, D. Identification of a common gene expression signature associated with immature clonal mesenchymal cell populations derived from bone marrow and dental tissues / D. Menicanin, S. Gronthos, P. M. Bartold [et al.] // Stem Cells and Development. – 2010. – Vol. 19, No. 10. – P. 1501-1510.

183. Mitchell, A. Cryopreservation of equine mesenchymal stem cells in 95 % autologous serum and 5 % DMSO does not alter post-thaw growth or morphology in vitro compared to fetal bovine serum or allogeneic serum at 20 or 95 % and DMSO at 10 or 5 / A. Mitchell, K. A. Rivas, R. Smith [et al.] // Stem cell research and therapy. – 2015. – Vol. 6. – P. 231.

184. Mokarizadeh, A. Mesenchymal stem cell derived microvesicles: Trophic shuttles for enhancement of sperm quality parameters / A. Mokarizadeh, M. A. Rezvanfar, K. Dorostkar [et al.] // Reproductive Toxicology. – 2013. – Vol. 42. – P. 78-84.

185. Moore, A. I. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa / A. I. Moore, E. L. Squires, J. E. Bruemmer [et al.] // Journal of Equine Veterinary Science. – 2006. – Vol. 26, No. 5. – P. 215–218.

186. Mudasir, B. Mesenchymal Stem Cell in Veterinary Sciences / B. Mudasir, P. Amar // Springer. – 2020. – P. 13–38.

187. Najafi, A. Enhancing post-thaw quality of ram epididymal sperm by supplementation of rutin in cryopreservation extender / A. Najafi, H. Mohammadi, S.D. Sharifi // Scientific Reports. – 2023. – P. 1 – 10.

188. Nedeau, A. E. A CXCL5- and bFGF-dependent effect of PDGF-B-activated fibroblasts in promoting trafficking and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells / A. E. Nedeau, R. J. Bauer, K. Gallagher [et al.] // *Experimental cell research*. – 2008. – Vol. 314, Iss.11-12. – P. 2176–2186.
189. Neila-Montero, M. An optimized centrifugation protocol for ram sperm ensuring high sample yield, quality and fertility / M. Neila-Montero, M. F. Riesco, R. Montes-Garrido [et al.] // *Theriogenology*. – 2022. – Vol. 191. – P. 179–191.
190. Neila-Montero, M. An optimized centrifugation protocol for ram sperm ensuring high sample yield, quality and fertility / M. Neila-Montero, M. F. Riesco, R. Montes-Garrido [et al.] // *Theriogenology*. – 2022. – Vol. 191. – P. 179-191.
191. Neila-Montero, M. Seminal plasma removal for medium-term preservation of ram sperm at 5 °C / M. Neila-Montero, M. Alvarez, M. F. Riesco [et al.] // *BMC veterinary research*. – 2024. – Vol. 20, No. 1. – P. 360.
192. Obara, C. Characteristics of three-dimensional prospectively isolated mouse bone marrow mesenchymal stem/stromal cell aggregates on nanoculture plates / C. Obara, K. Tomiyama, K. Takizawa [et al.] // *Cell and tissue research*. – 2016. – Vol. 366, No. 1. – P. 113–127.
193. Ohlstein, B. The stem cell niche: theme and variations / B. Ohlstein, T. Kai, E. Decotto [et al.] // *Current opinion in cell biology*. – 2004. – Vol. 16, No. 6. – P. 693–699.
194. Palomo, M. J. Effect of seminal plasma and butylated hydroxytoluene (BHT) concentration on ram sperm freezability / M. J. Palomo, W. García, A. Tabarez // *Small Ruminant Research*. – 2017. – Vol. 153. – P. 66–70.
195. Palumbo, R. High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment / R. Palumbo, M. E. Bianchi // *Biochemical pharmacology*. – 2004. – Vol. 68, No. 6. – P. 1165–1170.
196. Pasciu, V. An overview on assay methods to quantify ROS and enzymatic antioxidants in erythrocytes and spermatozoa of small domestic ruminants / V. Pasciu, M. Nieddu, F. D. Sotgiu [et al.] // *Animals*. – 2023. – Vol.13, No. 14. – P. 2300.

197. Pelagalli, A. Autocrine signals increase ovine mesenchymal stem cells migration through Aquaporin-1 and CXCR4 overexpression / A. Pelagalli, A. Nardelli, E. Lucarelli [et al.] // *Journal of cellular physiology*. – 2018. – Vol. 233, No. 8. – P. 6241–6249.
198. Petry, F. Manufacturing of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells on Microcarriers in a Dynamic System for Clinical Use / F. Petry, J. R. Smith, J. Leber [et al.] // *Stem cells international*. – 2016.
199. Potten, C. S. The stem cells of small intestinal crypts: where are they? / C. S. Potten, R. Gandara, Y. R. Mahida [et al.] // *Cell proliferation*. – 2009. – Vol. 42, No. 6. – P. 731–750.
200. Purdy, P. Ram Semen Processing, Cryopreservation and Non-surgical Insemination Protocol / P. Purdy // 2017; 5.
201. Rafiq, Q. A. Systematic microcarrier screening and agitated culture conditions improves human mesenchymal stem cell yield in bioreactors / Q. A. Rafiq, K. Coopman, A. W. Nienow [et al.] // *Biotechnology journal*. – 2016. – Vol. 11, No. 4. – P. 473–486.
202. Ratajczak, M. Z. Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies? / M. Z. Ratajczak, M. Kucia, T. Jadczyk [et al.] // *Leukemia*. – 2012. – Vol. 26, No. 6. – P. 1166–1173.
203. Rathore, A.K. Effects of high temperature on sperm morphology and subsequent fertility in Merino sheep / A. K. Rathore // *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*. – 1968. – Vol. 7. – P. 270–274.
204. Rekha, A. Comparison of commercial Triladyl extender with a tris-fructose-egg-yolk extender on the quality of frozen semen and pregnancy rate after transcervical AI in Bangladeshi indigenous sheep (*Ovis aries*) / A. Rekha, B. Zohara, F. Bari [et al.] // *Small Ruminant Research*. – 2015. – P. 134.
205. Rekha, A. Comparisons of commercial Triladyl and locally manufactured extenders for the chilling of semen and their effects on pregnancy rates

after transcervical AI in Bangladeshi Indigenous sheep (*Ovis aries*) / A. Rekha, B. Zohara, F. Bari [et al.] // *Animal Reproduction*. – 2016. – Vol. 13. – P. 735-742.

206. Riesco, M. F. Multiparametric Study of Antioxidant Effect on Ram Sperm Cryopreservation-From Field Trials to Research Bench / M. F. Riesco, M. Alvarez, L. Anel-Lopez [et al.] // *Animals (Basel)*. – 2021. – Vol. 11, No. 2. – P. 283.

207. Rizkallah, N. Factors Affecting the Survival of Ram Spermatozoa during Liquid Storage and Options for Improvement / N. Rizkallah, C. G. Chambers, S. P. de Graaf [et al.] // *Animals (Basel)*. – 2022. – Vol. 12, No. 3. – P. 244.

208. Roberts, E. L. Improved expansion of equine cord blood derived mesenchymal stromal cells by using microcarriers in stirred suspension bioreactors / E. L. Roberts, T. Dang, S. I. M. Lepage [et al.] // *Journal of biological engineering*. – 2019. – Vol. 13. – P. 25.

209. Russell, K. A. Canine Platelet Lysate Is Inferior to Fetal Bovine Serum for the Isolation and Propagation of Canine Adipose Tissue- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells / K. A. Russell, T. W. Gibson, A. Chong [et al.] // *PloS one*. – 2015. – Vol. 10, No. 9.

210. Ruster, B. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells / B. Ruster, S. Gottig, R. J. Ludwig [et al.] // *Blood*. – 2006. – Vol. 108, No. 12. – P. 3938–3944.

211. Ryusaku, D. Fertilization, comparative / D. Ryusaku, H. Noritaka // *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*. – 2018. – P. 344–349.

212. Sackstein, R. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone / R. Sackstein, J. S. Merzaban, D. W. Cain [et al.] // *Nature medicine*. – 2008. – Vol. 14, No. 2. – P. 181–187.

213. Saha, A. Cryopreservation Techniques for Ram Sperm / A. Saha, A. Mohammad, B. Farida // *Veterinary Medicine International*. – 2022. – P. 1–16.

214. Salamon, S. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination / S. Salamon, W. M. C. Maxwell // *Animal Reproduction Science*. – 1995. – Vol. 37, Iss. 3–4. – P. 185-249.

215. Salamon, S. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement / S. Salamon, W. M. C. Maxwell // *Animal Reproduction Science*. – 1995. – Vol. 38, Iss. 1–2. – P. 1–36.
216. Salamon, S. Storage of ram semen / S. Salamon, W. M. C. Maxwell // *Animal Reproduction Science*. – 2000. – Vol. 62, Iss. 1–3. – P. 77–111.
217. Salehinejad, P. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. In vitro cellular and developmental biology / P. Salehinejad, N. B. Alitheen, A. M. Ali [et al.] // *Animal*. – 2012. – Vol. 48, No. 2. – P. 75–83.
218. Sampaio, R. V. Generation of bovine (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) adipose tissue derived stem cells: isolation, characterization, and multipotentiality / R. V. Sampaio, M. R. Chiaratti, D. C. Santos [et al.] // *Genetics and molecular research*. – 2015. – Vol. 14, No. 1. – P. 53–62.
219. Sathe, S. R. Laparoscopic artificial insemination technique in small ruminants - a procedure review / S. R. Sathe // *Frontiers in veterinary science*. – 2018. – Vol. 5. – P. 266.
220. Scheinkonig, C. Adoption of long-term cultures to evaluate the cryoprotective potential of trehalose for freezing hematopoietic stem cells / C. Scheinkonig, S. Kappicht, H. J. Kolb [et al.] // *Bone marrow transplantation*. – 2004. – Vol. 34, No. 6. – P. 531–536.
221. Schubert, S. Serum-free human MSC medium supports consistency in human but not in equine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cell culture / S. Schubert, W. Brehm, A. Hillmann [et al.] // *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*. – 2018. – Vol. 93, No. 1. – P. 60–72.
222. Schwarz, C. Effects of different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells / C. Schwarz, U. Leicht, C. Rothe [et al.] // *Research in veterinary science*. – 2012. – Vol. 93, No. 1. – P. 457–462.

223. Seo, J. P. Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum for in vitro expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells / J. P. Seo, N. Tsuzuki, S. Haneda [et al.] // *Research in veterinary science*. – 2013. – Vol. 95(2). – P. 693–698.
224. Shah, F. S. A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells / F. S. Shah, X. Wu, M. Dietrich [et al.] // *Cytherapy*. – 2013. – Vol. 15, No. 8. – P. 979–985.
225. Shipley, C. F. B. Artificial insemination and embryo transfer in sheep / C. F. B. Shipley, B. C. Buckrell, M. J. A. Mylne [et al.] // *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. – 2007. – P. 629–641.
226. Silva, E. C. B. In vitro evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or acetamide / E. C. B. Silva, J. F. P. Cajueiro, S. V. Silva [et al.] // *Animal Reproduction Science*. – 2012. – Vol. 132, Iss. 3–4. – P. 155–158.
227. Singer, N. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation / N. G. Singer, A. I. Caplan // *Annual review of pathology*. – 2011. – Vol. 6. – P. 457–478.
228. Skalet, L. H. Effects of age and season on the type and occurrence of sperm abnormalities in Nubian bucks / L. H. Skalet, H. D. Rodrigues, H. O. Goyal [et al.] // *American journal of veterinary research*. – 1988. – Vol. 49, No. 8. – P. 1284–1289.
229. Spees, J. L. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function / J. L. Spees, R. H. Lee, C. A. Gregory // *Stem cell research and therapy*. – 2016. – Vol. 7, No. 1. – P. 125.
230. Spradling, A. Stem cells find their niche / A. Spradling, D. Drummond-Barbosa, T. Kai // *Nature*. – 2001. – Vol. 414. – P. 98–104.
231. Stewart, M. C. Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources, and Mechanisms of Action / M. C. Stewart, A. A. Stewart // *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. – 2011. – Vol. 27, No. 2. – P. 243–261.

232. Tanrikulu, M. D. Cryoprotective effects of mesenchymal stem cell and seminal plasma-derived extracellular vesicles on canine sperm / M. D. Tanrikulu, M. Çevik, M. Yüce [et al.] // *Theriogenology*. – 2025. – P. 244.
233. Terraciano, V. Differential response of adult and embryonic mesenchymal progenitor cells to mechanical compression in hydrogels / V. Terraciano, N. Hwang, L. Moroni [et al.] // *Stem cells*. – 2007. – Vol. 25, No. 11. – P. 2730–2738.
234. Thirumala, S. Clinical grade adult stem cell banking / S. Thirumala, W. S. Goebel, E. J. Woods // *Organogenesis*. – 2009. – Vol. 5, No. 3. – P. 143–154.
235. Thirumala, S. Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived adult stem cells / S. Thirumala, S. Zvonic, E. Floyd [et al.] // *Biotechnology progress*. – 2005. – Vol. 21, No. 5. – P. 1511–1524.
236. Thirumala, S. Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells / S. Thirumala, J. M. Gimble, R. V. Devireddy // *Stem cells and development*. – 2010. – Vol.19, No. 4. – P. 513–522.
237. Tian, Y. Isolation and morphological characterization of ovine amniotic fluid mesenchymal stem cells / Y. Tian, L. Tao, S. Zhao [et al.] // *Experimental animals*. – 2016. – Vol. 65, No. 2. – P. 125–134.
238. Tibary, A. Cryo-preservation of sperm and embryos in small ruminants/ A. Tibary, S. Manar // *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Veterinaires*. – 2018. – Vol. 6, No. 2. – P. 152-210.
239. Tong, C. K Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method / C. K. Tong, S. Vellasamy, B. C. Tan [et al.] // *Cell biology international*. – 2011. – Vol. 35 , No.3. – P. 221–226.
240. Toupadakis, C. A. Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood,

and umbilical cord tissue / C. A. Toupadakis, A. Wong, D. C. Genetos [et al.] // American journal of veterinary research. – 2010. – Vol. 71, No. 10. – P. 1237–1245.

241. Van de Hoek, M. Motility assessment of ram spermatozoa / M. Van de Hoek, J.P. Rickard, S.P. de Graaf // Biology (Basel). – 2022. – Vol. 11, No. 12. – P. 1715.

242. Verdanova, M. Evaluation of sericin as a fetal bovine serum-replacing cryoprotectant during freezing of human mesenchymal stromal cells and human osteoblast-like cells / M. Verdanova, R. Pytlik, M. H. Kalbacova // Biopreservation and biobanking. – 2014. – Vol. 12, No. 2. – P. 99–105.

243. Vidal, M. A. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow / M. A. Vidal, S. O. Robinson, M. J. Lopez [et al.] // Veterinary surgery. – 2008. – Vol. 37, No. 8. – P. 713–724.

244. Vieira, N. M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells / N. M. Vieira, V. Brandalise, E. Zucconi [et al.] // Cell transplantation. – 2010. – Vol. 19, No. 3. – P. 279–289.

245. Vishwanath, R. Motility characteristics and metabolism of ram sperm in the presence of ethanol / R. Vishwanath, M. A. Swan, I. G. White // Animal Reproduction Science. – 1992. – Vol. 27, No. 4. – P. 269–278.

246. Vozař, J. The Cryopreserved Sperm Traits of Various Ram Breeds: Towards Biodiversity Conservation / J. Vozař, A. Svoradova, A. Balazi [et al.] // Animals. – 2020. – Vol. 12, No. 10. – P. 1–13.

247. Wagner, W. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process / W. Wagner, P. Horn, M. Castoldi [et al.] // PLoS One. – 2008. – Vol. 3, No. 5. – e2213.

248. Wang, M. The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro / M. Wang, Y. Yang, D. Yang [et al.] // Immunology. – 2009. – Vol. 126, No. 2. – P. 220–232.

249. Wang, Q. BIX-01294 promotes the differentiation of adipose mesenchymal stem cells into adipocytes and neural cells in Arbas Cashmere goats /

Q. Wang, X. Wang, D. Lai [et al.] // Research in veterinary science. – 2018. – Vol. 119. – P. 9–18.

250. Wilson, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Nature reviews / A. Wilson, A. Trumpp // Immunology. – 2006. – Vol. 6, No. 2. – P. 93–106.

251. Wong, T. Y. Hyaluronan keeps mesenchymal stem cells quiescent and maintains the differentiation potential over time / T. Y. Wong, L. L. H. Huang, C. H. Chang [et al.] // Aging Cell. – 2017. – Vol. 16, No. 3. – P. 451-460.

252. Xie, T. A niche maintaining germ line stem cells in the Drosophila ovary / T. Xie, A. C. Spradling // Science. – 2000. – Vol. 290(5490). – P. 328–330.

253. Xiong, Y. Retention of the stemness of mouse adipose-derived stem cells by their expansion on human bone marrow stromal cell-derived extracellular matrix / Y. Xiong, J. He, W. Zhang [et al.] // Tissue engineering, Part A. – 2015. – Vol. 21, Iss. 11-12. – P. 1886–1894.

254. Yan, G. Ectopic expression of DAZL gene in goat bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances the trans-differentiation to putative germ cells compared to the exogenous treatment of retinoic acid or bone morphogenetic protein 4 signalling molecules / G. Yan, Y. Fan, P. Li [et al.] // Cell biology international. – 2015. – Vol. 39, No. 1. – P. 74–83.

255. Yoon, J. H. Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSCs and the growth factors from Wharton's jelly / J. H. Yoon, E. Y. Roh, S. Shin [et al.] // BioMed research international. – 2013.

256. Yoshida, M. Conservation of sperms: current status and new trends / M. Yoshida // Animal Reproduction Science. – 2000. – Vol. 60–61. P. 349-355.

257. Zakirova, E. Effect of mesenchymal stem cells on animal semen during storage / E. Zakirova, A. Malanyeva, A. Aimaletdinov // Veterinary Science Today. – 2023. – Vol. 12. – P. 354-362.

258. Zhang, L. Effect of fumigation height and time on cryopreservation of ram semen / L Zhang., X. Wang, C. Jiang [et al.] // Scientific reports. – 2024. – Vol. 14, No. 1, 10944.

259. Zhang, Y. L. Induction of goat bone marrow mesenchymal stem cells into putative male germ cells using mRNA for STRA8, BOULE and DAZL / Y. L. Zhang, P. Z. Li, J. Pang [et al.] // *Cytotechnology*. – 2019. – Vol. 71, No. 2. – P. 563–572.
260. Zhangfan, D. Interactions between induced pluripotent stem cells and stem cell niche augment osteogenesis and bone regeneration / D. Zhangfan, X. Pan, X. Wang [et al.] // *Smart Materials in Medicine*. – 2021. – Vol. 2. – P. 196–208.
261. Zhuge, Y. Adult stem cell differentiation and trafficking and their implications in disease / Y. Zhuge, Z. J. Liu, O. C. Velazquez // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2010. – Vol. 695. – P. 169–183.
262. Zuk, P. A. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno [et al.] // *Tissue Eng*. – 2001. – Vol. 7, Iss. 2. – P. 211–228.