

ПУШКИНА ВАРВАРА СЕРГЕЕВНА

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ
СПЕРМЫ БАРАНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
ветеринарных наук

Санкт-Петербург – 2026

Работа выполнена на кафедре генетических и репродуктивных биотехнологий Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ).

Научный руководитель – Корочкина Елена Александровна
доктор ветеринарных наук, доцент.

Официальные оппоненты: Гнездилова Лариса Александровна
доктор ветеринарных наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Российский государственный
университет народного хозяйства имени В. И.
Вернадского», кафедра биотехнологий и
продовольственной безопасности, профессор;

Иолчиев Байлар Садрадинович
доктор биологических наук,
ФГБНУ «Всероссийский научно-
исследовательский институт племенного дела»
лаборатория биологии воспроизведения
сельскохозяйственных животных, ведущий
научный сотрудник.

Ведущая организация – ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К. А. Тимирязева».

Защита диссертации состоится «08» декабря 2026 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета 35.2.034.02 на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургского государственного университета ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д. 5, тел. 8(812)388-36-31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СПбГУВМ по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д. 5., и на официальном сайте <https://spbguvm.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Хватов
Виктор Александрович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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, Зеленевский, 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); Корнеев-Жилева, 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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 ГОСТ32222–2013. Протокол подготовки 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 7×10^8 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 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 $38\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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, pH – 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.

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, pH – 5,55), первая опытная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл + разбавитель OptiXcell (IMV, Франция)+МСК КМ 2×10^6 кл/мл, pH – 5,14), вторая опытная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл + разбавитель OptiXcell (IMV, Франция) + МСК ЖТ 2×10^6 кл/мл, pH – 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 сперматозоидов были разведены в соотношении 1:100.

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 сперматозоидов 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 см^3) 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 см^3) брали из бедренной кости иглой для аспирации костного мозга и переносили в стерильную пробирку с гепарином. Пробирки с биоматериалом доставляли в лабораторию при $4 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 часов.

Жировую ткань в условиях ламинарного бокса промывали буфером PBS, измельчали при помощи микроножниц и инкубировали 45 мин при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в растворе коллагеназы (0,075 %, тип 2) (ПанЭко, Россия) при постоянном помешивании. Полученную суспензию фильтровали, центрифугировали, полученный осадок разводили средой $\alpha\text{MEM} + 10\text{ \% FBS}$ и высевали в культуральные флаконы площадью 25 см^2 . 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 $\alpha\text{MEM} + 10\text{ \% FBS}$ и высевали в культуральные флаконы площадью 25 см^2 . Через 24 часа среду заменяли и удаляли неприкрепленные клетки. Спустя 48 часов процедуру повторили. Монослой МСК КМ формировался к 10 суткам после выделения.

Для проведения экспериментов по влиянию компонентов МСК на сохранность и поддержание качества спермы баранов клетки деконсервировали и культивировали в среде $\alpha\text{MEM} + 10\text{ \% FBS}$. Начиная с 3-го пассажа после размораживания, их использовали в работе.

Производные МСК получали следующим образом: кондиционированную среду (КС) отбирали через 72 часа 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 2×10^6 кл/мл. Затем суспензию аликвотировали и фасовали в пробирки Эппендорфа. Лизат получали методом криодеструкции путем двукратного быстрого погружения в жидкий азот ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты первого этапа исследований апробации протокола заморозки спермы баранов

В результате первого этапа работы был подобран протокол криоконсервации спермы баранов-производителей, который включал в себя следующие этапы: центрифугирование (режим: 700 об/мин в течение 15 минут), удаление семенной плазмы, разбавление 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. 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-оттаивания. 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.

Результаты второго этапа исследований Влияние МСК и их производных на качество нативной спермы баранов

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. МСК из костного мозга в количестве 2×10^6 кл/мл способствовали сохранению двигательной активности сперматозоидов в течение первого часа после получения спермы. При добавлении МСК ЖТ 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 ($p < 0,01$) (рисунок 1).

В контрольной группе в течение двух часов после получения спермы количество нормальных сперматозоидов уменьшалось, а число клеток с дефектами хвоста увеличивалось (рисунок 2). 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).

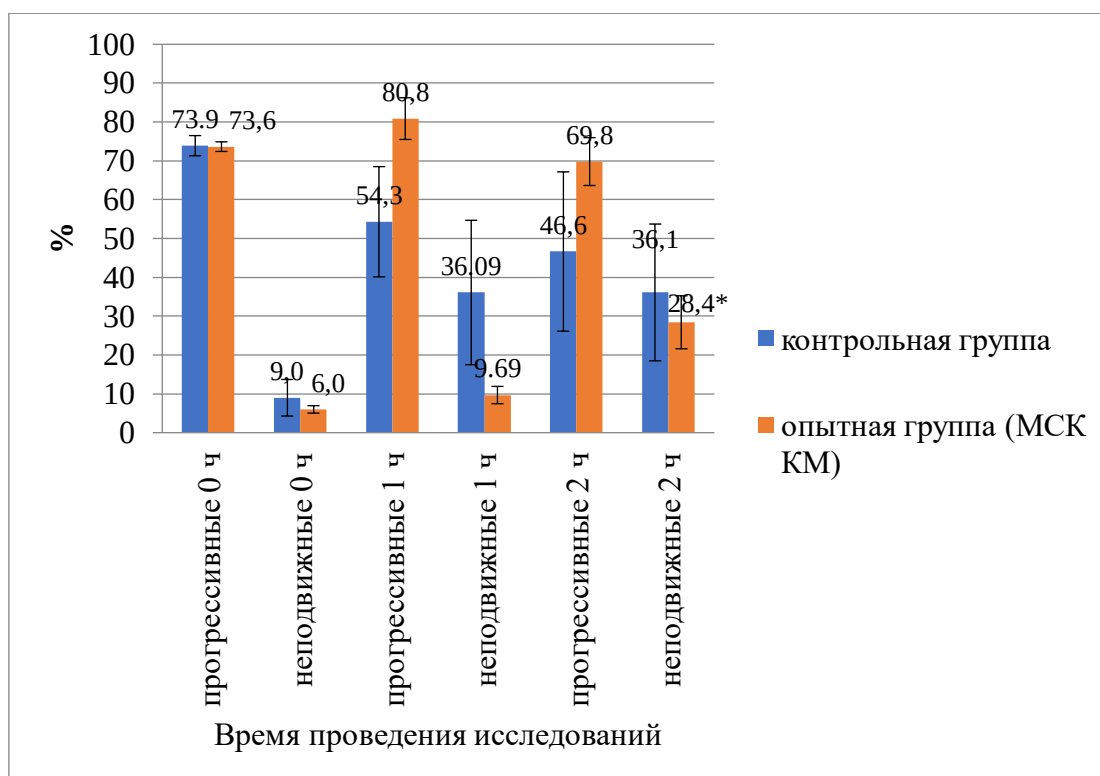


Рисунок 1 – Подвижность сперматозоидов баранов.
 Примечание: * $p < 0,01$, по сравнению с 0 часов после взятия спермы.

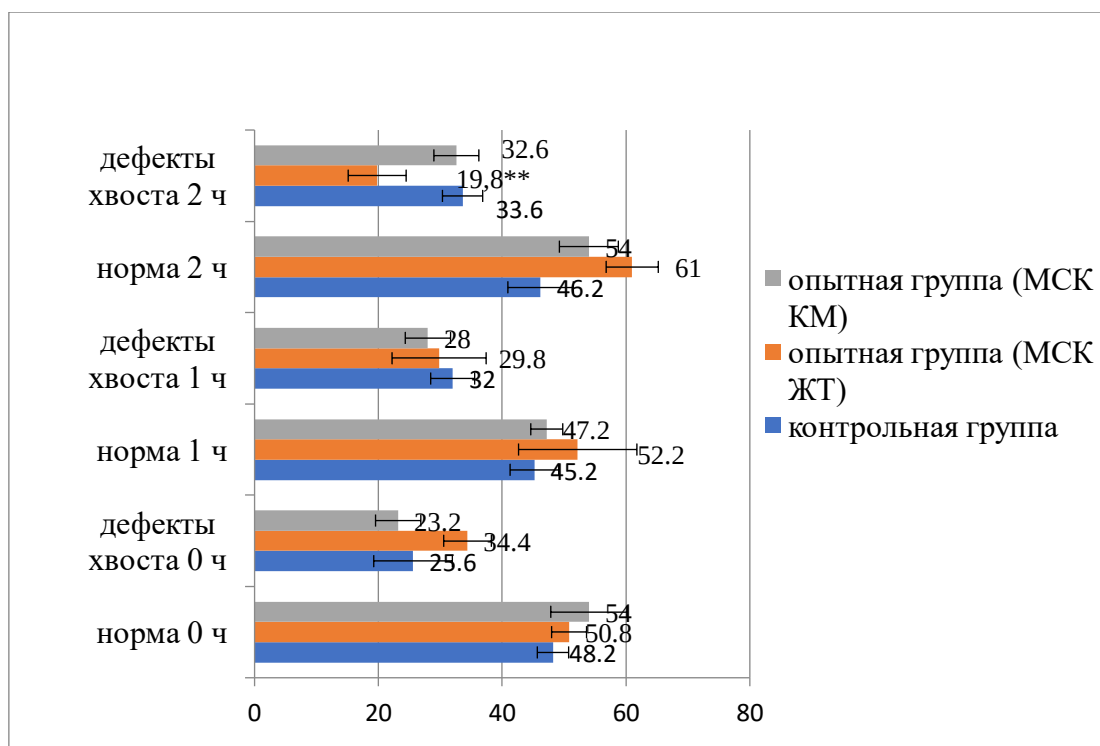


Рисунок 2 – Морфология сперматозоидов баранов при инкубации с МСК КМ и МСК ЖТ.
 Примечание: ** $p < 0,05$, по сравнению с 0 часов после взятия спермы.

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 ($p<0,01$) (рисунок 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.

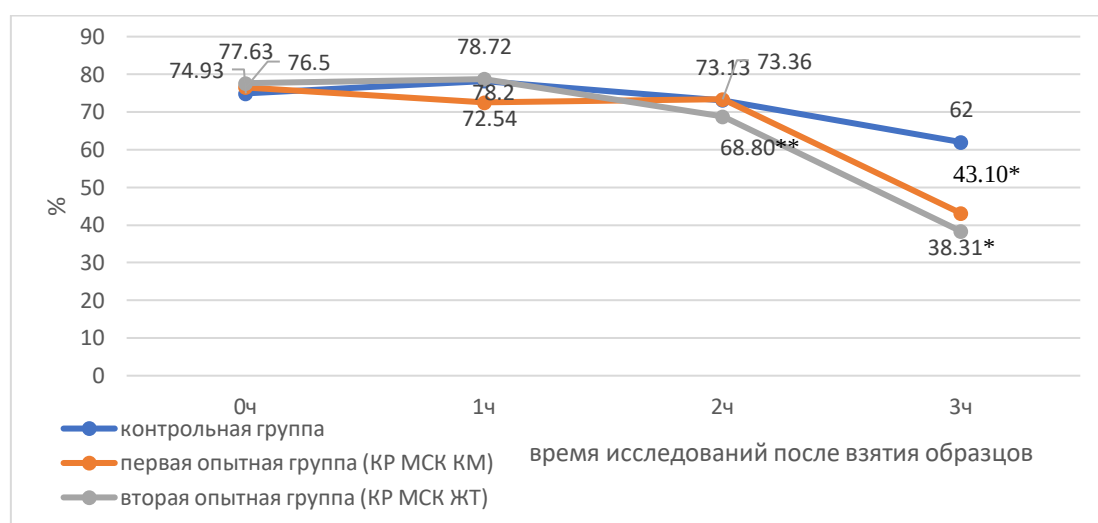


Рисунок 3 – Динамика прогрессивности движений сперматозоидов баранов в процессе трехчасовой инкубации с лизатом МСК (КР) (n=10).

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

В процессе трехчасовой инкубации спермы баранов с кондиционированной средой МСК наблюдалось снижение количества прогрессивно двигающихся 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 прогрессивно двигающихся сперматозоидов на 3-й час инкубации при температуре 37 °С было в первой опытной группе при добавлении КС МСК из костного мозга.

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.

Результаты третьего этапа исследований.

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

В ходе третьего этапа исследования 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 ($36,10 \pm 3,75$ % 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 ($34,50 \pm 2,40$ %) (рисунок 4).

Проводя анализ двигательной активности сперматозоидов, 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. Наибольшая переживаемость сперматозоидов отмечалась в опытных группах при использовании разбавителя OptiXcell и МСК (рисунок 5).

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.

В рамках реализации четвертого этапа исследований, было установлено 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 $44,2 \pm 2,75$ %.

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 (рисунок 6).

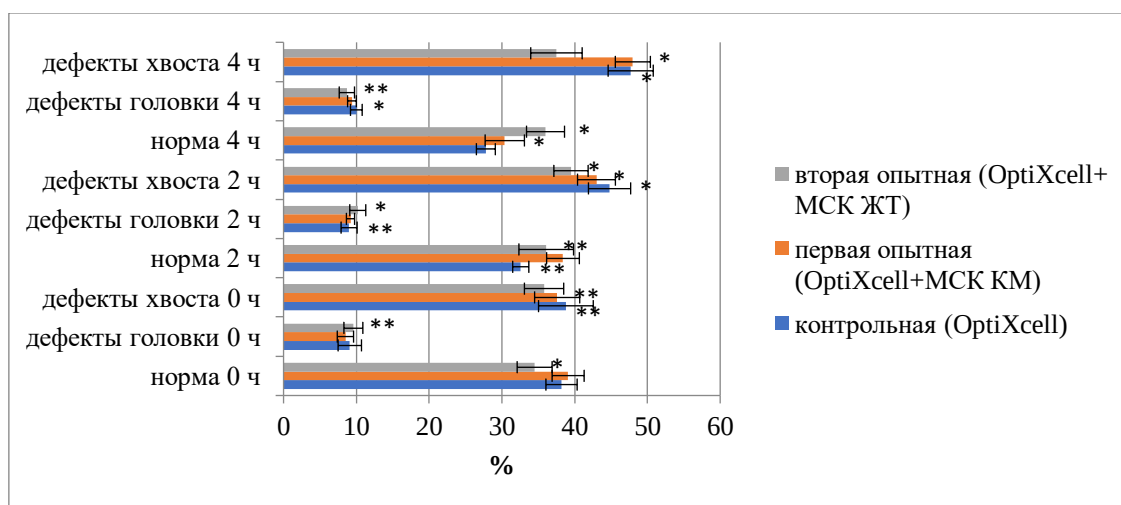


Рисунок 4 – Результаты оценки морфологии сперматозоидов баранов после оттаивания при четырехчасовой инкубации с МСК (n=10).

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

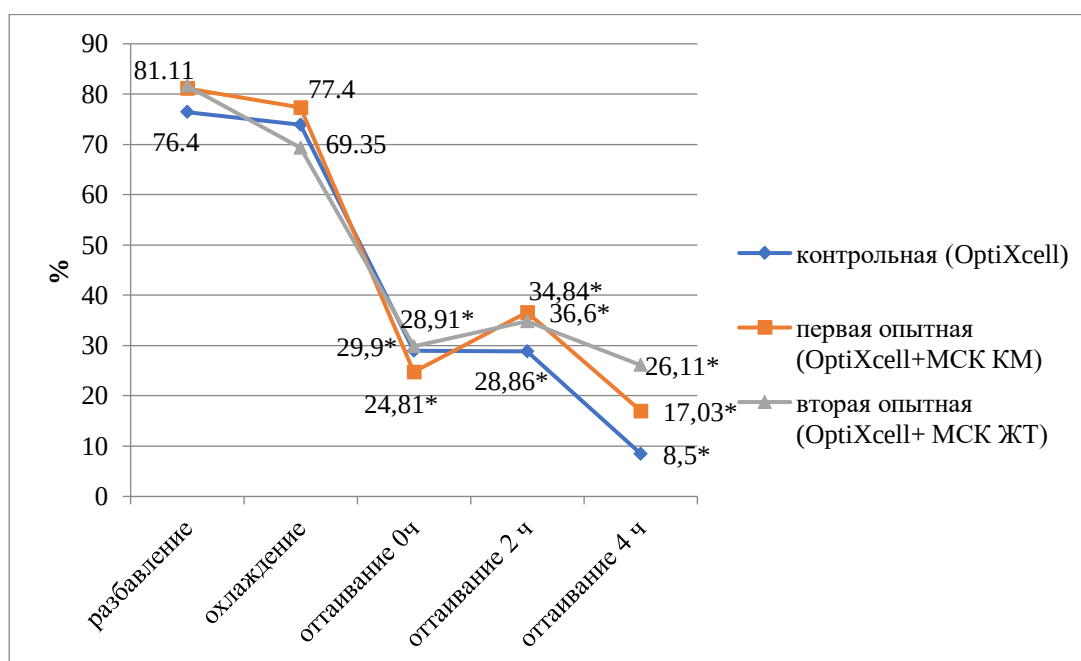


Рисунок 5 – Динамика прогрессивности движений сперматозоидов баранов в процессе криоконсервации и в течение четырехчасовой инкубации после оттаивания (n=10).

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

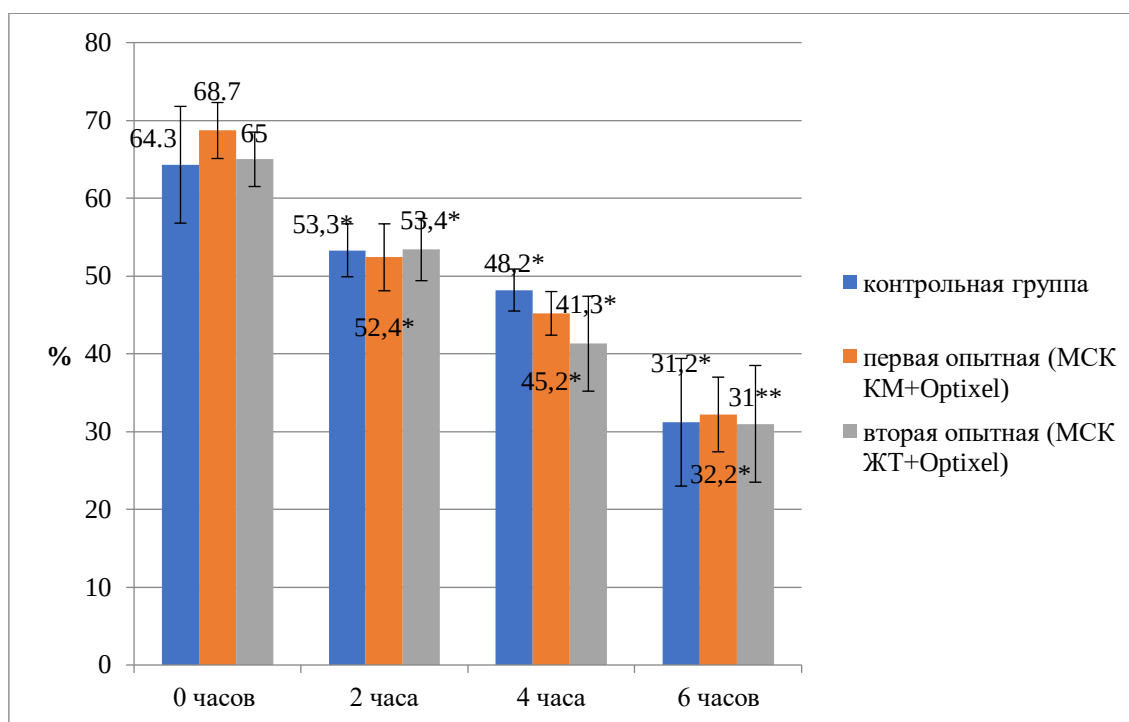


Рисунок 6 – Результаты оценки жизнеспособности сперматозоидов баранов в процессе шестичасовой инкубации с МСК (ЖТ и КМ) (n=10).

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

При добавлении МСК из костного мозга в сперму баранов после криоконсервации (рисунок 7) 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.

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 прогрессивно двигающихся 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 прогрессивно двигающихся сперматозоидов на 1,45 % (контрольная группа) и 15,25 % (опытная группа МСК КМ) через 2 часа исследований. 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 ($p < 0,01$) (рисунок 8).

Во второй опытной группе (МСК ЖТ) отмечалось сокращение количества прогрессивно двигающихся 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.

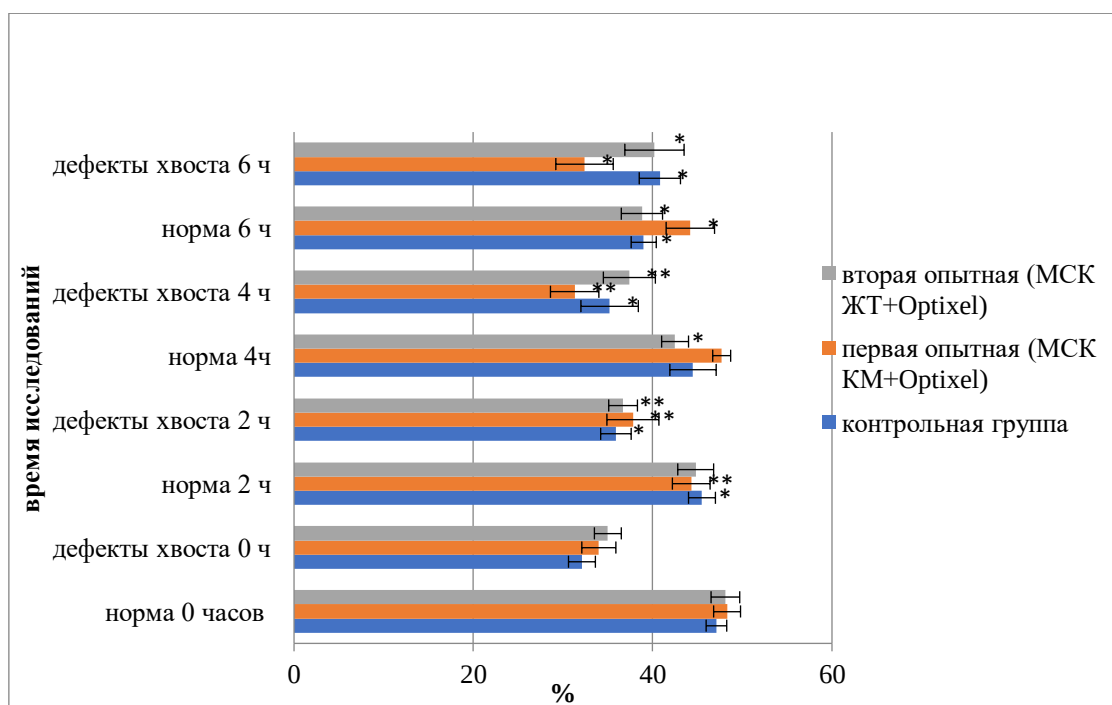


Рисунок 7 – Результаты оценки морфологии сперматозоидов баранов в процессе шестичасовой инкубации с МСК (n=10).

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

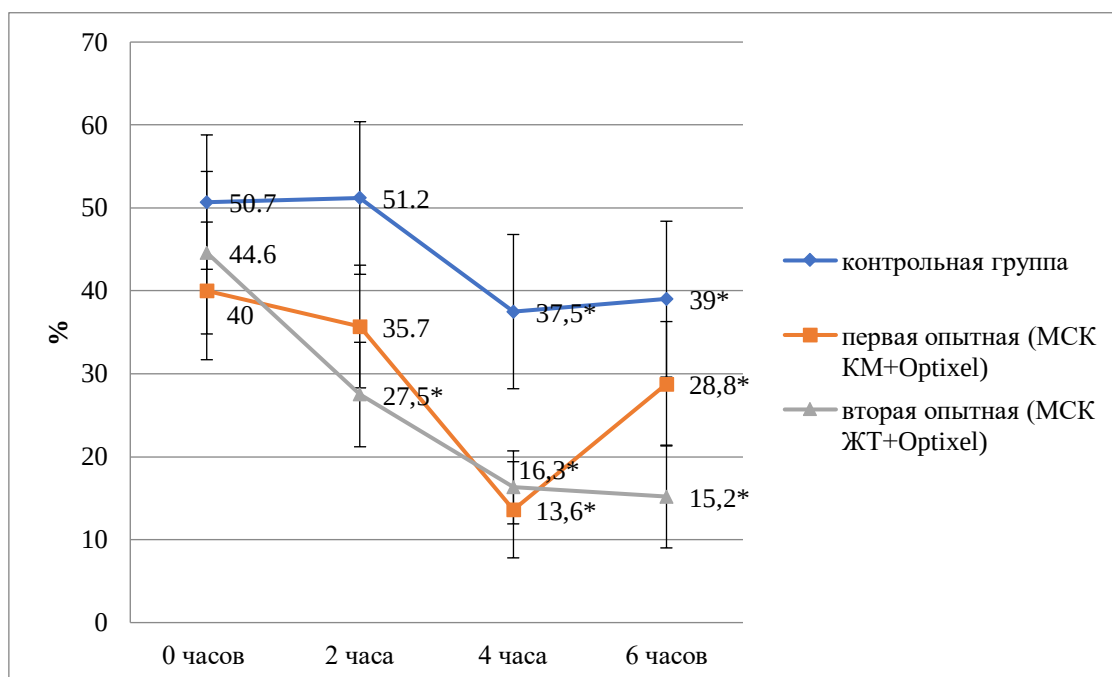


Рисунок 8 – Динамика прогрессивности движений сперматозоидов баранов в процессе шестичасовой инкубации с МСК (n=10).

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

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 четвертого этапа исследований.

Выделение, накопление и криоконсервация мезенхимальных стволовых клеток баранов

Полученную после взятия и обработки жировой ткани 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 °С 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. 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 криопробирке. Был использован следующий протокол замораживания: инкубация при комнатной температуре 30 мин, 1 час при -20 °С, затем на 1 час в пары жидкого азота (- 80 °С), после чего поместили в сосуд Дьюара в жидкий азот (-196 °С). Через 5 суток 1 образец был разморожен согласно принятому протоколу – в течение 30 сек на водяной бане с температурой 40 °С. Клетки были посеяны в ростовую среду α MEM:FBS (9:1) без антибиотиков.

В дальнейшем МСК, выделенные из костного мозга, 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-й 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.

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 часов 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, часы. 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 часов, на пике роста 10-14 часов, и к текущему пассажу роста культур (37 пассаж) – 13-16 часов. 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 (гемопозитические 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 3-м пассаже была гетерогенной.

Результаты кариологического анализа и направленной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток

Для кариологического анализа клетки МСК ЖТ на стадии логарифмического роста обрабатывали $0,6 \text{ мкг/мл}$ колхицина в среде в течение 2 ч при 37°C в CO_2 -инкубаторе. Делящиеся клетки снимали. После обработки гипотоническим $0,56\%$ -ным раствором KCl в течение 15 мин при 37°C 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-м пассаже показал, что модальное число хромосом составляет 54 и соответствует диплоидному набору хромосом этого вида животного.

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.

ВЫВОДЫ

1. Эффективным протоколом криоконсервации является: центрифугирование (режим: 700 об/мин в течение 15 минут), удаление семенной плазмы, разбавление 1:4 OptiXcell, 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.

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 (гемопоэтические стволовые клетки).

3. Оптимальным 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.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Перед проведением процесса замораживания-оттаивания эякулята баранов необходимо выполнить тщательную подготовку семени, ее оценку, центрифугирование (режим: 700 об/мин в течение 15 минут) с удалением 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. Благодаря регенеративному эффекту, МСК рекомендуем использовать в качестве среднего компонента разбавителя для криоконсервации, а также в качестве реабилитационной среды без значительной потери морфофункциональных характеристик сперматозоидов баранов. При этом эффективным протоколом использования МСК и сперматозоидов является 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.

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.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ

1. 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.
2. Сравнение методов морфологической оценки сперматозоидов баранов с использованием набора SPERM BLUE и окрашивания по Романовскому-Гимзе /

Е. А. Корочкина, Е. Ю. Финагеев, Д. Е. Главацкая, В. С. Пушкина // Международный вестник ветеринарии. – 2024. – № 1. – С. 350-355.

3. Влияние кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток баранов на качественные показатели сперматозоидов / Е. А. Корочкина, А. В. Трифонова, А. Ю. Нечаев, В. С. Пушкина, Д. Е. Главацкая // Международный вестник ветеринарии. – 2024. – № 2. – С. 276-284.

4. Влияние МСК из жировой ткани и костного мозга баранов на качественные показатели их / Е. А. Корочкина, Е. Ю. Финагеев, Д. Е. Главацкая, В.С. Пушкина, А. В. Трифонова, М. М. Ивановская // Ветеринария. – 2024. – № 1. – С. 37-41.

5. Использование мезенхимальных стромальных клеток при криоконсервации спермы баранов-производителей / Е. А. Корочкина, Е. Ю. Финагеев, В. С. Пушкина, Д. Е. Главацкая, А. В. Трифонова // Ветеринария. – 2024. – № 11. – С. 43-47.

6. Влияние лизата мезенхимальных стволовых клеток (МСК) баранов на качественные показатели сперматозоидов / Е. А. Корочкина, А. В. Трифонова, Е. Ю. Финагеев, В. С. Пушкина, Д. Е. Главацкая // Вестник КрасГАУ. – 2024. – № 12(213). – С. 94-100.

7. 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.

Публикации в журналах, включенных в международные базы цитирования Scopus:

8. 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, A. A. Lavrik, V. S. Pushkina, D. K. Griffin, M. N. Romanov // German Journal of Veterinary Research. – 2025. – Vol. 5, No. 4. – P. 26-41.

Публикации в сборниках материалов конференций:

9. 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.

10. Корочкина, Е. А. Динамика значений кинематических показателей подвижности сперматозоидов баранов в процессе криоконсервации при использовании различных средовых компонентов / Е. А. Корочкина, Д. Е. Главацкая, В. С. Пушкина // Актуальные проблемы ветеринарной репродуктологии и современные пути их решения : Сборник научных трудов Международной научно-практической конференции, Махачкала, 19–20 сентября 2024 года. – Махачкала: Общество с ограниченной ответственностью "Издательство АЛЕФ", 2024. – С. 132-139.

11. Пушкина, В. С. апробация протокола криоконсервации спермы баранов-производителей / В. С. Пушкина, Е. А. Корочкина // Актуальные проблемы лечения и профилактики болезней молодняка : материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию учреждения образования "Витебская ордена "Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины", Витебск, 04–06 ноября 2024 года. – Витебск: Витебская государственная академия ветеринарной медицины, 2024. – С. 322-325.9