

УДК: 576.362:636.082.453.52

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.2.276

ВЛИЯНИЕ КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ СРЕДЫ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК БАРАНОВ НА КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМАТОЗОИДОВ

Корочкина Е.А.^{1*} – д-р ветеринар. наук, доц. кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий (ORCID 0000-0002-7011-4594); Трифонова А.В.² – канд. биол. наук., директор по науке; Нечаев А. Ю.¹ – д-р ветеринар. наук, доц., зав. кафедрой общей, частной и оперативной хирургии; Пушкина В. С.¹ – студ.; Главацкая Д. Е.¹ – студ.

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

² ООО «Научный центр цитогенетического тестирования»

*e.kora@mail.ru

Ключевые слова: сперма, бараны-производители, кондиционированная среда, мезенхимальные стромальные клетки из жировой ткани и костного мозга

Keywords: sperm, breeding rams, conditioned medium, mesenchymal stem cell from adipose tissue and bone marrow

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

Поступила: 16.05.2024

Принята к публикации: 10.06.2024

Опубликована онлайн: 28.06.2024



РЕФЕРАТ

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани и костного мозга баранов на качественные показатели сперматозоидов в процессе трехчасовой инкубации. Были проведены взятие и исследование спермы половозрелых баранов романовской породы и породы Дорпер в возрасте 1-2,5 лет. Всего было взято 10 образцов (n=10). Кондиционированную среду (КС) отбирали через 72 ч культивирования в матрасах с 90-100% монослоем клеток. Было сформировано три группы проб по 10 образцов в каждой (n=10): контрольная (сперматозоиды 7×10^{10} кл/мл + фосфатно-солевой буфер 100 мкл, pH – 7,4), первая опытная (сперматозоиды 7×10^{10} кл/мл + кондиционированная среда (КС) МСК КМ в соотношении 1:1, pH – 7,2), вторая опытная (сперматозоиды 7×10^{10} кл/мл + кондиционированная среда (КС) МСК ЖТ в соотношении 1:1, pH – 7,2). Сравнение значений производилось на каждом этапе инкубации (0, 1, 2 и 3 часа) внутри каждой группы. Было установлено, что использование кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани и костного мозга баранов и сперматозоидов (концентрация 7×10^{10} кл/мл) в соотношении 1:1 является эффективным протоколом в аспекте улучшения качественных показателей половых клеток. В процессе трехчасовой инкубации спермы баранов с кондиционированной средой мезенхимальных стромальных клеток (КС) наблюдалось сни-

жение 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. Статистически значимое уменьшение количества морфологически нормальных сперматозоидов было зарегистрировано в процессе часовой инкубации с кондиционированной средой МСК из костного мозга баранов и составляло $43,90\pm 2,22\%$ ($p=0,04$).

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Овцеводство является одной из ведущих отраслей животноводства во многих странах, экономическая эффективность которой складывается из двух производственных показателей: 1. получение шерсти; 2. получение мяса. Проводя ретроспективное изучение развития данной отрасли в нашей стране, нужно отметить, что на сегодняшний день рентабельность и высокая конкурентоспособность современного овцеводства определяются наличием качественных селекционных параметров (скороспелость, плодовитость и т.д.), а также соблюдением зоотехнических требований (цена-качество корма) [2]. Приоритетной областью развития современного овцеводства является отбор ценных чистопородных баранов-производителей, а также разработка способов, повышающих морфофункциональные характеристики спермы. Особую актуальность имеет подготовка спермы к процессу замораживания, в частности использование сред/средовых компонентов для увеличения переживаемости сперматозоидов. Одним из перспективных и малоизученных направлений на сегодняшний день является применение мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и их компонентов. Многочисленными исследованиями установлены иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства данных клеток [4-13]. Кроме того, на сегодняшний день доказана не только эффективность применения МСК, но и их компонентов, в частности кондиционированной среды, терапевтическое действие которой достигается благодаря опосредованной паракринной активности [7]. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение влияния кондиционированной среды мезен-

химальных стромальных клеток из жировой ткани и костного мозга баранов на качественные показатели сперматозоидов в процессе трехчасовой инкубации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследования были проведены в научно-образовательной лаборатории по трансплантации эмбрионов животных на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», а также на базе отдела разработки клеточных биотехнологий ООО «НС-Рабиес». Были проведены взятие и исследование спермы половозрелых баранов романовской породы и породы Дорпер в возрасте 1-2,5 лет. Всего было взято 10 образцов ($n=10$). Отбор проб был произведен с помощью искусственной вагины модели IMV (Франция) согласно ГОСТ 32222-2013 [3]. Оценка спермы состояла из макро- и микроскопического исследований. При макроскопической оценке проводили исследование объема, запаха и цвета спермы, при микроскопической - определение концентрации, исследование морфологии и подвижности [1].

Исследование проводилось с помощью микроскопа Levenhuk MED 45T. Для подсчета концентрации сперматозоидов использовалась камера Горяева [1]. Оценка подвижности сперматозоидов проводилась с использованием программы Аргус-CASA. Полученные образцы были разведены в соотношении 1:100. Оценка аликвоты спермы производилась под увеличением 10×10 с использованием камеры Маклера. При оценке подвижности учитывалось количество прогрессивнодвигающихся, непрогрессивнодвигающихся и неподвижных сперматозоидов, а также скорость криволинейного движе-

ния сперматозоидов. Оценка морфологии проводилась ручным способом (200 сперматозоидов в каждом образце), для оценки которой использовался набор для дифференцированного окрашивания Sperm Blue (Microptic) с предварительной фиксацией мазков (фиксатор: 10 минут). Экспозиция мазка в красителе составила 18 минут. Далее была проведена микроскопия (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.

Жировую ткань (ЖТ) и костный мозг (КМ) получали после убоя баранов породы Дорпер (n=2) в крестьянско-фермерском хозяйстве Волховского района Ленинградской области. ЖТ (2 см³) вырезали подкожно и помещали в стерильную пробирку с 10 мл транспортной 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 отдела разработки клеточных биотехнологий ООО «НС-Рабисес» пробы обрабатывали. Жировую ткань в условиях ламинарного бокса промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), измельчали при помощи микроножниц и инкубировали 45 мин при 37 °С в 0,075%-ном растворе коллагеназы (тип 2) (ПанЭко, Россия) при постоянном помешивании. Полученную суспензию фильтровали, центрифугировали, полученный осадок разводили средой αMEM + 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 фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), центрифугировали, полученный осадок еще два раза промывали описан-

ным способом. Затем к осадку добавляли среду αMEM + 10 % FBS и высевали в культуральные флаконы площадью 25 см². Через 24 часа среду заменяли и удаляли неприкрепленные клетки. Спустя 48 часов процедуру повторяли. Монослой МСК КМ формировался к 10 суткам после выделения.

В дальнейшем выделенные МСК пассировали для увеличения их количества. На втором пассаже клетки криоконсервировали и депонировали в криобанке. Для проведения экспериментов по влиянию компонентов МСК на сохранность и поддержание качества спермы баранов клетки деконсервировали и культивировали в среде αMEM + 10 % FBS. 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. Было сформировано три группы проб по 10 образцов в каждой (n=10): контрольная (сперматозоиды 7x10¹⁰ кл/мл + фосфатно-солевой буфер (PBS) 100 мкл, pH – 7,4), первая опытная (сперматозоиды 7x10¹⁰ кл/мл + кондиционированная среда (КС) МСК КМ в соотношении 1:1, pH – 7,2), вторая опытная (сперматозоиды 7x10¹⁰ кл/мл + кондиционированная среда (КС) МСК ЖТ в соотношении 1:1, pH – 7,2). С целью установления степени переживаемости сперматозоидов в средах, содержащих КС МСК, и определения ее влияния на качественные показатели сперматозоидов, была проведена четырехэтапная оценка качества спермы: 0, 1, 2 и 3 часа после инкубации при температуре 38°C. Сравнение значений производилось на каждом этапе инкубации (0, 1, 2 и 3 часа) внутри каждой группы. При этом достоверными считались различия при p≤0,01 и p≤0,05. Статистическая обработка данных была проведена при помощи программы Stattech и Medstatistic «Медицинская Статистика» с вычислением показателей вариационного ряда и t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ/RESULTS

После проведения макроскопического исследования образцов были получены

следующие результаты: сперма имела белый цвет и специфический запах, объемом в среднем составлял $0,6 \pm 0,05$ мл, концентрация – $6,71 \pm 0,85$ млрд.

Как известно, кондиционированные среды являются производными стволовых клеток и обладают такими же свойствами, что и мезенхимальные стромальные клетки. Кроме этого, данный компонент МСК имеет преимущества с точки зрения производства, сохранения, обработки, в связи с этим, его чаще всего рассматривают как готовый биологический продукт [7,8]. Кондиционированная среда представляет собой комбинацию биомолекул и факторов роста в ростовой среде клеточных культур, при этом состав может варьировать в зависимости от исходной ткани (жировая ткань, костный мозг и другие) [7,11].

Результаты влияния кондиционированной среды МСК из жировой ткани и костного мозга баранов на морфофункциональные характеристики сперматозоидов отражены на рисунках 1 и 2.

Согласно данным рисунка 1, 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.

Что касается не прогрессивно двигающихся 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), $p < 0,01$).

Таким образом, достоверно определено, что инкубация спермы в кондиционированной среде мезенхимальных стромальных клеток способствует сохранению двигательной активности сперматозоидов. При этом количество прогрессивно двигающихся сперматозоидов, в процессе трехчасовой инкубации в кондиционированной среде МСК из костного мозга составляет $40,71 \pm 10,20\%$ ($p < 0,01$), из жировой ткани – $32,95 \pm 10,92\%$ ($p < 0,01$) соответственно. В процессе двухчасовой инкубации в кондиционированной среде МСК ЖТ – $55,70 \pm 10,20\%$ ($p \leq 0,05$).

Можно предположить, что механизм получения данного результата основан на эффекте продуцируемых мезенхимальных стромальных клеток в среду культивирования биологически активных веществ, которые обладают регенеративными и защитными свойствами, и, в свою очередь, оказывают положительное действие на половые клетки [4-13]. Стоит отметить результаты исследования Kim, G.A с соавтор (2020), согласно которым, кондиционированная среда МСК имеет низкую иммуногенность, проявляет выраженные антиоксидантные и антиапоптотические свойства [10].

Результаты оценки морфологии сперматозоидов баранов в процессе трехчасовой инкубации с кондиционированной средой МСК из жировой ткани и костного мозга отражены на рисунке 2.

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 ($p \leq 0,05$)

на 1-й час инкубации; во второй опытной группе (КС МСК ЖТ) в 1,8 раз ($p < 0,01$) на 3-й час инкубации по сравнению с данными 0 часов инкубации.

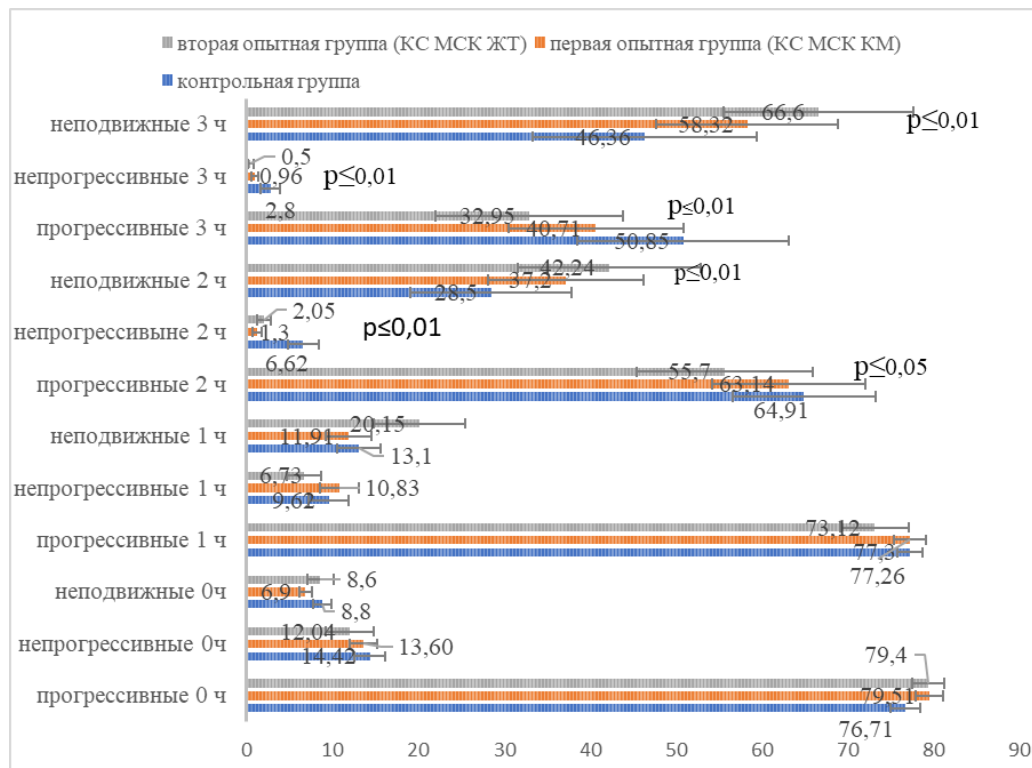


Рисунок 1 – Динамика прогрессивности движений сперматозоидов баранов в процессе трехчасовой инкубации с кондиционированной средой МСК (КС) ($M \pm m$, $n=10$).

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 про-

цессе часовой инкубации с кондиционированной средой МСК из костного мозга баранов и составляло $43,90 \pm 2,22\%$ ($p=0,04$).

При оценке кинематических параметров подвижности сперматозоидов было зарегистрировано достоверное снижение скорости криволинейного движения сперматозоидов на третий час инкубации с кондиционированной средой МСК, полученной из жировой ткани, при этом разница значений составила 2,5 раза ($p \leq 0,05$) по сравнению с показателем 0 часов инкубации.

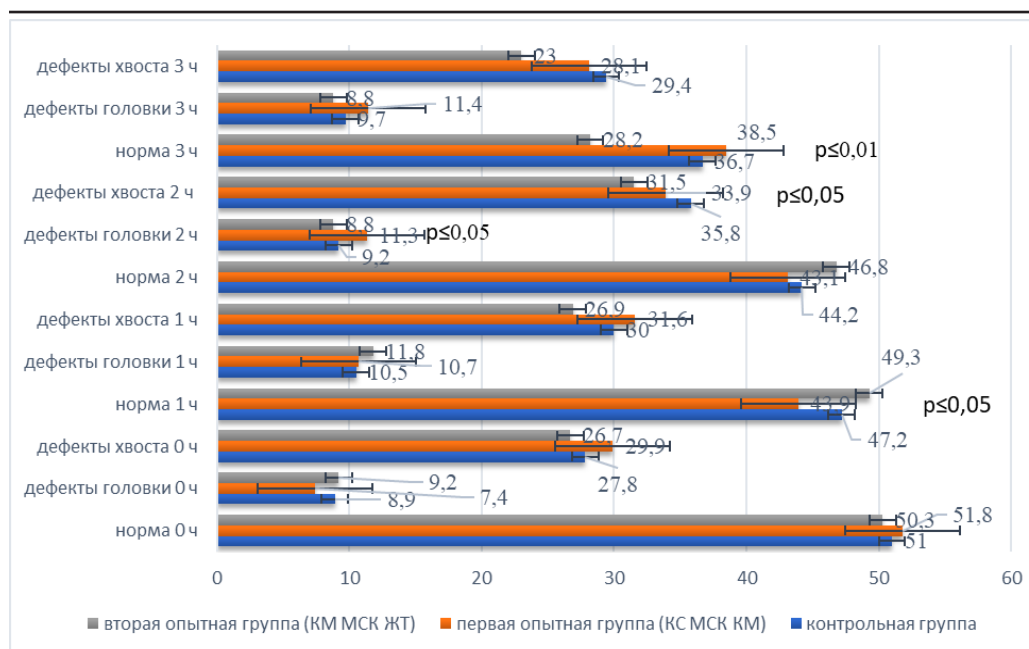


Рисунок 2 – Результаты оценки морфологии сперматозоидов баранов в процессе трехчасовой инкубации с кондиционированной средой МСК (КС) ($M \pm m$, $n=10$).

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

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Проведенные нами исследования и полученные результаты указывают на положительное влияние кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани и костного мозга на морфофункциональные характеристики сперматозоидов баранов в процессе трехчасовой инкубации. Вероятно, данный эффект, главным образом, связан с факторами роста и антиоксидантами. Так, Gunawardena T.N. Ас соавтор. (2019) указывают на то, что питательная среда и добавки, в которых растут МСК оказывают влияние на секрецию клетками различных факторов роста, которые будут получены в кондиционированной среде [6]. Mahiddine F.Y. с соавтор. (2020) установили, что факторами роста кондиционированной среды являются тиоредоксин (низкомолекулярный белок), который имеет антиоксидантную активность, а также сывороточный альбумин, который выполняет важную роль в улучшении

фертильности и криоконсервации спермы за счет повышения подвижности и защиты структуры сперматозоидов от негативного воздействия низких температур [8].

Таким образом, проведенными исследованиями:

1. Установлено, что эффективным протоколом использования кондиционированной среды МСК из жировой ткани и костного мозга для спермы баранов-производителей является соотношение 1:1 при концентрации сперматозоидов баранов - 7×10^{10} кл/мл;

2. Доказано, что инкубация спермы в кондиционированной среде МСК способствует сохранению двигательной активности сперматозоидов. При этом количество прогрессивнодвигающихся сперматозоидов, в процессе трехчасовой инкубации в кондиционированной среде из костного мозга составляет $40,71 \pm 10,20\%$ ($p < 0,01$), из жировой ткани – $32,95 \pm 10,92\%$ ($p < 0,01$) соответственно;

3. Зарегистрировано статистически

значимое увеличение процента неподвижных сперматозоидов 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), $p < 0,01$);

4. В процессе часовой инкубации сперматозоидов в кондиционированной среде МСК из костного мозга наблюдалось достоверное сокращение количества нормальных сперматозоидов в 1,2 раза ($p = 0,04$), а также увеличение количества сперматозоидов с дефектами головок ($p = 0,03$, 2 часа инкубации);

5. Количество нормальных сперматозоидов в процессе трехчасовой инкубации в кондиционированной среде МСК из жировой ткани составило $28,20 \pm 7,53\%$ ($p = 0,01$). Достоверной разницы значений между дефектами сперматозоидов во второй опытной группе (КС МСК ЖТ) выявлено не было.

THE INFLUENCE OF MESENCHYMAL STEM CELLS CONDITIONED MEDIUM FROM ADIPOSE TISSUE AND BONE MARROW OF RAMS ON THE QUALITY PARAMETERS OF SPERMATOZOA

Korochkina E. A.^{1*} - PhD. In Veterinary science, Associate Professor, Department of Genetic and Reproductive Technologies; Trifonova A. V.² - PhD in biological science, the director of science; Nechaev A. Y.¹ - PhD, In Veterinary science, Associate Professor, Department of Genetic and Reproductive Technologies; Pushkina V. S.¹ - student; Glavatskay D.¹ - student.

¹St. Petersburg state academy of veterinary medicine

²LLC "Scientific Center for Cytogenetic Testing"

*e.kora@mail.ru

Financing: The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation No. 23-26-00157, <https://rscf.ru/project/23-26-00157>

ABSTRACT

The purpose of this research was to study the influence of the conditioned medium of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow of sheep on the quality parameters of sperm during a three-hour incubation. The sperm of sexually mature rams of the Romanov and Dorper breeds at the age of 1-2.5 years was taken and examined. A total of 10 samples were taken ($n=10$). Conditioned medium (CM) was collected after 72 h of cultivation in mattresses with 90-100% cell monolayer. Three groups of samples, 10 in each, were formed: control (spermatozoa 7×10^{10} cells/ml + PBS buffer 100 μ l, pH – 7.4), first experimental (spermatozoa 7×10^{10} cells/ml + conditioned medium (CM) MSC BM 2×10^8 cells/ml, pH – 7.2), the second experimental one (spermatozoa 7×10^{10} cells/ml + conditioned medium (CM) MSCs in adipose tissue 2×10^8 cells/ml, pH – 7.2). Comparisons of values were made at each incubation stage (0, 1, 2 and 3 hours) within each group. It was found that the use of conditioned medium of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow of sheep at a concentration of 2×10^8 cells/ml and spermatozoa at a concentration of 7×10^{10} cells/ml in terms of improving the quality indicators of germ cells. During a three-hour incubation of sheep sperm with conditioned medium of mesenchymal stem cells (MS), a decrease in the number of progressively moving sperm was observed. At the same time, a statistically significant difference was recorded in the first experimental group (CS MSC BM) on the 3rd hour of incubation: 1.9 times ($p < 0.01$), as well as in the second experimental group (CS MSC VT) on the 2nd and 3rd hour of incubation compared with indicators of 0 hour of incubation: 1.4 times ($p \leq 0.05$) and 2.4 ($p < 0.01$), respectively. A statistically significant decrease in the number of morphologically normal sperm was recorded during an hour-long incubation

with conditioned medium of MSCs from sheep bone marrow and amounted to $43.90 \pm 2.22\%$ ($p=0.04$).

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Баженова Н. Б., Племяшов К. В., Корочкина Е. А. Оценка качественных показателей спермы животных. Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2023. 25 с.
2. Войтюк, М. М., Мачнева О. П. Современное состояние овцеводства в России // Эффективное животноводство. 2021. №4 (170). С.102-105. DOI: 10.24-412/cl-33489-2021-4-102-105.
3. ГОСТ 32222–2013. Средства воспроизводства. Сперма. Методы отбора проб. – М.: Стандарт информ. 2018. 10 с.
4. Alvites R, Branquinho M, Sousa AC, Lopes B, Sousa P, Mauricio AC. Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Paracrine Activity-Immunomodulation Mechanisms and How to Influence the Therapeutic Potential. *Pharmaceutics*. 2022 Feb 9;14(2):381. doi: 10.3390/pharmaceutics14020381. PMID: 35214113; PMCID: PMC8875256.
5. Ivanisova D., Bohac M., Culenova M., Smolinska V., Danisovic L. Mesenchymal-Stromal-Cell-Conditioned Media and Their Implication for Osteochondral Regeneration // *International Journal of Molecular Science*. 2023. 24(10). Article number 9054. DOI: 0.3390/ijms24109054.
6. Gunawardena T.N.A., Rahman M.T., Abdullah B.J.J., Abu Kasim N.H. Conditioned media derived from mesenchymal stem cell cultures: The next generation for regenerative medicine // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2019. 13(4). Pp 569–586. DOI: 10.1002/term.2806.
7. Liu P., XieXr., Wu H. et al. Conditioned medium of mesenchymal stem cells pretreated with H2O2 promotes intestinal mucosal repair in acute experimental colitis // *Scientific reports*. 2022. 12(1). Article number 20772. DOI: 10.1038/s41598-022-24493-y.
8. Mahiddine FY, Kim JW, Qamar AY, Ra JC, Kim SH, Jung EJ, Kim MJ. Conditioned Medium from Canine Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cells Improved

Dog Sperm Post-Thaw Quality-Related Parameters. *Animals (Basel)*. 2020 Oct 16;10(10):1899. doi: 10.3390/ani10101899.

9. Nguyen-Truong M, Hematti P, Wang Z. Current status of myocardial restoration via the paracrine function of mesenchymal stromal cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2021 Jul 1;321(1):H112-H127. doi: 10.1152/ajpheart.00217.2021. Epub 2021 Jun 4. PMID: 34085844.
10. R Ra K., Oh H.J., Kim G.A., Kang S.K., Ra J.C., Lee B.C. High Frequency of Intravenous Injection of Human Adipose Stem Cell Conditioned Medium Improved Embryo Development of Mice in Advanced Maternal Age through Antioxidant Effects // *Animals*. 2020. 10(6). Article number 978. DOI: 10.3390/ani10060978.
11. Smolinská V, Boháč M, Danišovič Ľ. Current status of the applications of conditioned media derived from mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Physiol Res*. 2023 Oct 27;72(S3):S233-S245. doi: 10.33549/physiolres.935186. PMID: 37888967; PMCID: PMC10669946.
12. Tian Z, Yu T, Liu J, Wang T, Higuchi A. Introduction to stem cells. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2023; 199:3-32. doi: 10.1016/bs.pmbts.2023.02.012. Epub 2023 Mar 15. PMID: 37678976.
13. Yuan Q.L., Zhang Y.g., Chen Q. Mesenchymal Stem Cell (MSC)-Derived Extracellular Vesicles: Potential Therapeutics as MSC Trophic Mediators in Regenerative Medicine // *Anatomical Record*. 2020. 303(6). Pp 1735–1742. DOI: 10.1002/ar.24186.

REFERENCES

1. Bazhenova N. B., Plemyashov K. V., Korochkina E. A. Otsenkakachestvennykh pokazateley spermy zhivotnykh. Sankt-Peterburg: Sankt-Peterburgskiy gosudarstvennyy universitet veterinarnoy meditsiny, 2023. 25 s.
2. Voytyuk, M. M., Machneva O. P. Sovremennoe sostoyanie ovtssevodstva v Rossii // Effektivnoe zhivotnovodstvo. 2021. №4 (170). S.102-105. DOI: 10.24-412/cl-33489-2021-4-102-105.
3. GOST 32222–2013. Sredstva vosproizvodstva. Sperma. Metody otbora prob. – M.:

- Standart inform. 2018. 10 s.
4. Alvites R, Branquinho M, Sousa AC, Lopes B, Sousa P, Mauricio AC. Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Paracrine Activity-Immunomodulation Mechanisms and How to Influence the Therapeutic Potential. *Pharmaceutics*. 2022 Feb 9;14(2):381. doi: 10.3390/pharmaceutics14020381. PMID: 35214113; PMCID: PMC8875256.
5. Ivanisova D., Bohac M., Culenova M., Smolinska V., Danisovic L. Mesenchymal-Stromal-Cell-Conditioned Media and Their Implication for Osteochondral Regeneration // *International Journal of Molecular Science*. 2023. 24(10). Article number 9054. DOI: 0.3390/ijms24109054.
6. Gunawardena T.N.A., Rahman M.T., Abdullah B.J.J., Abu Kasim N.H. Conditioned media derived from mesenchymal stem cell cultures: The next generation for regenerative medicine // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2019. 13(4). Pp 569–586. DOI: 10.1002/term.2806.
7. Liu P., Xie Xr., Wu H. et al. Conditioned medium of mesenchymal stem cells pretreated with H2O2 promotes intestinal mucosal repair in acute experimental colitis // *Scientific reports*. 2022. 12(1). Article number 20772. DOI: 10.1038/s41598-022-24493-y.
8. Mahiddine FY, Kim JW, Qamar AY, Ra JC, Kim SH, Jung EJ, Kim MJ. Conditioned Medium from Canine Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cells Improved Dog Sperm Post-Thaw Quality-Related Parameters. *Animals (Basel)*. 2020 Oct 16;10(10):1899. doi: 10.3390.
9. Nguyen-Truong M, Hematti P, Wang Z. Current status of myocardial restoration via the paracrine function of mesenchymal stromal cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2021 Jul 1;321(1):H112-H127. doi: 10.1152/ajpheart.00217.2021. Epub 2021 Jun 4. PMID: 34085844.
10. Ra K., Oh H.J., Kim G.A., Kang S.K., Ra J.C., Lee B.C. High Frequency of Intravenous Injection of Human Adipose Stem Cell Conditioned Medium Improved Embryo Development of Mice in Advanced Maternal Age through Antioxidant Effects // *Animals*. 2020. 10(6). Article number 978. DOI: 10.3390/ani10060978.
11. Smolinská V, Boháč M, Danišovič Ľ. Current status of the applications of conditioned media derived from mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Physiol Res*. 2023 Oct 27;72(S3):S233-S245. doi: 10.33549/physiolres.935186. PMID: 37888967; PMCID: PMC10669946.
12. Tian Z, Yu T, Liu J, Wang T, Higuchi A. Introduction to stem cells. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2023; 199:3-32. doi: 10.1016/bs.pmbts.2023.02.012. Epub 2023 Mar 15. PMID: 37678976.
13. Yuan Q.L., Zhang Y.g., Chen Q. Mesenchymal Stem Cell (MSC)-Derived Extracellular Vesicles: Potential Therapeutics as MSC Trophic Mediators in Regenerative Medicine // *Anatomical Record*. 2020. 303(6). Pp 1735–1742. DOI: 10.1002/ar.24186.