

УДК: 576.362:636.39.082.453.53

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.4.493

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ КОЗЛОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Корочкина Е.А.^{1*} – д-р ветеринар. наук, доц. каф. генетических и репродуктивных биотехнологий (ORCID0000-0002-7011-4594); **Трифопова А.В.**² – канд. биол. наук, директор по науке; **Финагеев Е.Ю.**¹ – канд. ветеринар. наук, асс. каф. генетических и репродуктивных биотехнологий; **Главацкая Д.Е.**¹ – асп.; **Пушкина В.С.**¹ – асп.

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

² ООО «Научный центр цитогенетического тестирования»

*e.kora@mail.ru

Ключевые слова: сперма, козлы-производители, мезенхимальные стволовые клетки, криоконсервация.

Keywords: sperm, breeding goats, mesenchymal stem cell, cryopreservation

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

Поступила: 08.11.2024

Принята к публикации: 02.12.2024

Опубликована онлайн: 16.12.2024



РЕФЕРАТ

Целью исследований явилось установление эффективности использования мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и костного мозга козлов после криоконсервации спермы. Результаты четырехчасовой инкубации образцов спермы после оттаивания указывают на наличие достоверной разницы значений при инкубации с мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) из жировой ткани/костного мозга и без них (среда OptiXcell). Так, в процессе четырехчасовой инкубации спермы после оттаивания, статистически значимое сокращение количества нормальных сперматозоидов отмечалось во всех исследуемых группах. При этом разница значений в контрольной группе составила 1,3 ($p < 0,01$, 2 часа) и 1,4 ($p < 0,01$, 4 часа) раза; первой опытной группе – 1,1 ($p < 0,01$, 4 часа) раз; второй опытной группе – 1,1 ($p < 0,01$, 2 часа) и 1,3 ($p < 0,01$, 4 часа) раз по сравнению с результатами 0 часов инкубации. Образцы контрольной и первой опытной групп имели одинаковую динамику достоверных изменений двигательной активности сперматозоидов при четырехчасовой инкубации после оттаивания – статистически значимое снижение количества прогрессивно двигающихся сперматозоидов в 1,6 раз ($p < 0,05$ – контрольная группа, $p < 0,01$ – первая опытная группа), и, напротив, достоверное увеличение количества не прогрессивно двигающихся сперматозоидов в 1,3 раза ($p < 0,05$ для обеих групп). Выраженная двигательная активность наблюдалась у сперматозоидов первой опытной группы по завершению 4-х часовой инкубации, равная $21,45 \pm 4,58$ %. Наибольшее количество жизнеспособных сперматозоидов было зарегистрировано в первой опытной группе при 4-х часовой

инкубации образцов с МСК, полученного из костного мозга – $37,13 \pm 2,21\%$, наибольшее количество сперматозоидов с интактными акросомами - во второй опытной группе (МСК ЖТ). Таким образом, можно предположить, что МСК оказывает регенеративный эффект на структуру сперматозоидов после криоконсервации. Для раскрытия механизма воздействия МСК на структуру сперматозоидов необходимо продолжить исследования.

ВВЕДЕНИЕ/INTRODUCTION

В настоящее время, в условиях активного импортозамещения, сельское хозяйство вносит существенный вклад в экономическое развитие страны. Животноводство обеспечивает продовольственную безопасность и доступность продуктов питания для всех слоев населения.

Роль козоводства, как отрасли продуктивного животноводства, достаточно велика (получение молока, мяса, пуха, шерсти и кожи). Козий пух - тончайший вид волокна животноводческого происхождения – отличается хорошими прядельными свойствами и валикостопностью, легкостью, эластичностью, относительной прочностью и малой теплопроводностью [5]. Кроме того, при правильном разведении, козы способствуют сохранению экосистем и могут быть использованы в качестве экологического инструмента для контроля вредных сорняков, сокращения случаев лесных пожаров, улучшения пастбищных угодий и среды обитания диких животных [4].

Разведение коз считается одним из наиболее высокопродуктивных. Козы неприхотливы к уходу и условиям содержания, способны адаптироваться в различных природно-климатических условиях, обладают высокой резистентностью, относительно скороспелы, многоплодны. Ввиду биологической особенности, козы, переваривающие до 67% клетчатки, могут пастись на территориях, непригодных для других видов сельскохозяйственных животных. Несмотря на очевидные преимущества данной животноводческой отрасли, огромным сдерживающим фактором ее развития является использование естественного осеменения, что образует проблему хронического дефицита высокоценных козлов-производителей, способных стойко передавать свои продуктивные качества потомству. Учитывая низ-

кую криорезистентность сперматозоидов козлов, актуальным является разработка и применение реабилитационных сред для улучшения качественных показателей репродуктивных клеток после оттаивания.

Целью исследований явилось установление эффективности использования мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и костного мозга козлов после криоконсервации спермы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследования были проведены в лаборатории кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», а также в отделе разработки клеточных биотехнологий ООО «НС-Рабиес». Было проведено взятие спермы половозрелых козлов зааненской и альпийской пород в возрасте 1-2,5 лет ($n=10$) с помощью искусственной вагины модели IMV (Франция) согласно ГОСТ32222–2013 [2].

Исследование спермы проводилось с помощью микроскопа Levenhuk MED 45T. Для подсчета концентрации сперматозоидов использовалась камера Горяева [1].

Оценка подвижности сперматозоидов проводилась с использованием программы Аргус-CASAи камеры Маклера (увеличение 10X10). При этом полученные образцы были разведены в соотношении 1:100. При оценке подвижности учитывалось количество прогрессивно движущихся, непрогрессивно движущихся и неподвижных сперматозоидов. Оценка морфологии проводилась по методу Крюгера (200 сперматозоидов в каждом образце), при этом для окрашивания мазков был использован набор SpermBlue (Microptic)с предварительной фиксацией мазков (фиксатор: 10 минут, краситель:

18 минут) и последующей микроскопией (увеличение с использованием объектива 100x10, иммерсионное масло). Оценка жизнеспособности проводилась по методике BrightVit (Microptic, 200 сперматозоидов в каждом образце). Оценку целостности акросомы проводили согласно методике FluoAcro (Microptic) (100 сперматозоидов в каждом образце).

Жировую ткань (ЖТ) и костный мозг (КМ) получали после убоя козлов зааненской и чешской пород (n=3) в крестьянско-фермерском хозяйстве Волховского района Ленинградской области. ЖТ (2 см³) вырезали подкожно и 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 0,075%-ном растворе коллагеназы (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 по-

сле выделения.

Сперму разбавляли в соотношении 1:4 (разбавитель OptiXcell (IMV, Франция)), далее - охлаждали при температуре + 4°C в течение двух часов для стабилизации взаимодействия между спермой и средой [5]. После чего производили ручную упаковку разбавленной спермы при помощи микропипетки (Minitube) и пайет объемом 0,25 мл при температуре + 4°C. Протокол заморозки образцов спермы состоял из двух этапов: 1 - соломинки помещали в гоблеты и далее - стаканы выдерживали 7 мин на уровне 4 см над жидким азотом; 2 - полное погружение в жидкий азот для дальнейшего хранения [6, 7]. Оттаивание спермы производилось при температуре +37°C в течение 30 секунд [8].

Экспериментальная работа включала в себя следующие этапы: после оттаивания спермы было сформировано три группы (n=5 в каждой): контрольная (сперматозоиды 7x10¹⁰ кл/мл + разбавитель OptiXcell (IMV, Франция), общий объем 100 мкл, pH – 5,8), первая опытная (сперматозоиды 7x10¹⁰ кл/мл + разбавитель OptiXcell (IMV, Франция) + МСК КМ 2x10⁸ кл/мл, pH – 5,3), вторая опытная (сперматозоиды 7x10¹⁰ кл/мл + разбавитель OptiXcell (IMV, Франция) + МСК ЖТ 2x10⁸ кл/мл, pH – 5,4). С целью установления степени переживаемости сперматозоидов после оттаивания была проведена шестичасовая инкубация спермы в средах, содержащих OptiXcell и мезенхимальные стромальные клетки при температуре 38°C с оценкой качественных показателей каждые два часа после оттаивания (0, 2, 4, 6 часов). С целью установления эффективности данного протокола работы спермы козлов-производителей после криоконсервации с МСК, была проведена одна серия эксперимента.

Статистическая обработка данных была проведена при помощи программы Stattech и MedCalc с вычислением показателей вариационного ряда и t-критерий Стьюдента. Сравнение значений производилось на каждом этапе инкубации внутри группы. При этом достоверными считались различия при p≤0,01 и p≤0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ/RESULTS

Согласно микроскопической оценке качества спермы козлов, проведенной после ее взятия и охлаждения, были получены следующие результаты: количество прогрессивнодвигающихся сперматозоидов – $81,77 \pm 2,18$ % и $81,23 \pm 1,78$ %, количество сперматозоидов без дефектов – $77,63 \pm 0,81$ % и $66,63 \pm 1,93$ %, количество жизнеспособных сперматозоидов – $75,25 \pm 1,77$ % и $67,25 \pm 2,16$ % соответственно.

Результаты влияния мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и костного мозга козлов на морфофункциональные характеристики сперматозоидов после криоконсервации отражены на рисунках 1-4.

Согласно протоколу исследований, включенных в план 2024 года (дизайн эксперимента № 2, грант Российского научного фонда № 23-26-00157, <https://rscf.ru/project/23-26-00157/>), целью работы было проведение микроскопического исследования спермы козлов после оттаивания в процессе шестичасовой инкубации. Проведенные исследования указывают на переживаемость сперматозоидов козлов после оттаивания в течение четырех часов. Результаты исследований после шестичасовой инкубации указывают на тотальную потерю жизнеспособности.

Согласно результатам оценки морфологии сперматозоидов, отраженных на рисунке 1, процесс криоконсервации спермы козлов негативно отражается на морфологической структуре половых гамет, при этом отмечается сокращение количества нормальных сперматозоидов на 19,5%-25,4%. В процессе глубокой заморозки наблюдается значительное поражение хвостовой части сперматозоидов козлов – увеличение дефектов хвоста на 15,12% - 21,74 % по сравнению с результатами исследований нативных образцов спермы.

В процессе четырехчасовой инкубации спермы после оттаивания, статистически значимое сокращение количества нормальных сперматозоидов отмечалось во всех исследуемых группах. При этом

разница значений в контрольной группе составила 1,3 ($p < 0,01$, 2 часа) и 1,4 ($p < 0,01$, 4 часа) раз; первой опытной группе – 1,1 ($p < 0,01$, 4 часа) раз; второй опытной группе – 1,1 ($p < 0,01$, 2 часа) и 1,3 ($p < 0,01$, 4 часа) раз по сравнению с результатами 0 часов инкубации. Было зарегистрировано статистически значимое увеличение количества дефектов шейки и хвостовой части сперматозоидов в контрольной и второй опытной группах. Так, в контрольной группе разница значений составила 1,3-1,5 раз ($p < 0,01$) при анализе дефектов шейки и 1,2 ($p < 0,05$) - 1,4 ($p < 0,01$) раз при анализе дефектов хвостовой части сперматозоидов. Что касается разницы значений среди патологических форм сперматозоидов при инкубации образцов с МСК их жировой ткани, то было зафиксировано достоверное увеличение половых клеток с дефектами шейки на 2-й и 4-й час инкубации в 1,4 ($p < 0,05$) - 1,6 ($p < 0,01$) раз, а также достоверное увеличение сперматозоидов с дефектами хвоста на 4-й час инкубации в 1,2 раза ($p < 0,01$). Таким образом, анализ полученных данных указывает на наибольшую сохранность морфологически нормальных сперматозоидов при их инкубации с МСК из костного мозга и жировой ткани. Кроме того, наиболее выраженное поражение хвостовой части отмечалось у сперматозоидов контрольной группы (разбавитель OptiXcell), чего нельзя сказать о результатах, полученных при анализе патологических форм образцов опытных групп, у которых наибольшей зоной поражения была шейка сперматозоида.

Результаты оценки подвижности сперматозоидов отражены на рисунке 2. Согласно полученным данным, образцы контрольной и первой опытной групп имели одинаковую динамику достоверных изменений двигательной активности сперматозоидов при четырехчасовой инкубации после оттаивания – статистически значимое снижение количества сперматозоидов с прогрессивным движением в 1,6 раз ($p < 0,05$ – контрольная группа, $p < 0,01$ – первая опытная группа), и,

напротив, достоверное увеличение количества сперматозоидов с непрогрессивным движением в 1,3 раза ($p < 0,05$ для обеих групп).

Результаты оценки двигательной активности сперматозоидов по завершению 4-х часовой инкубации указывают на значительную разницу значений между группами. В частности, наибольшая подвижность отмечалась у сперматозоидов первой опытной группы – $21,45 \pm 4,58$ %. Кроме того, достоверная разница значений данного показателя в результате 4-х часовой инкубации по сравнению с данными 0 часов после оттаивания была следующей: контрольная группа – 3,7 ($p < 0,01$),

первая опытная группа – 2,0 ($p < 0,01$), вторая опытная группа – 3,0 ($p < 0,01$). Наименьшая разница количества сперматозоидов с непрогрессивным движением при внутригрупповой оценке в результате 4-х часовой инкубации после оттаивания отмечалась у второй опытной группы – 1,3 раза ($p < 0,01$). Таким образом, инкубация спермы козлов-производителей с МСК из костного мозга и жировой ткани оказывает положительное действие на двигательную активность сперматозоидов. Результаты оценки жизнеспособности сперматозоидов отражены на рисунке 3.

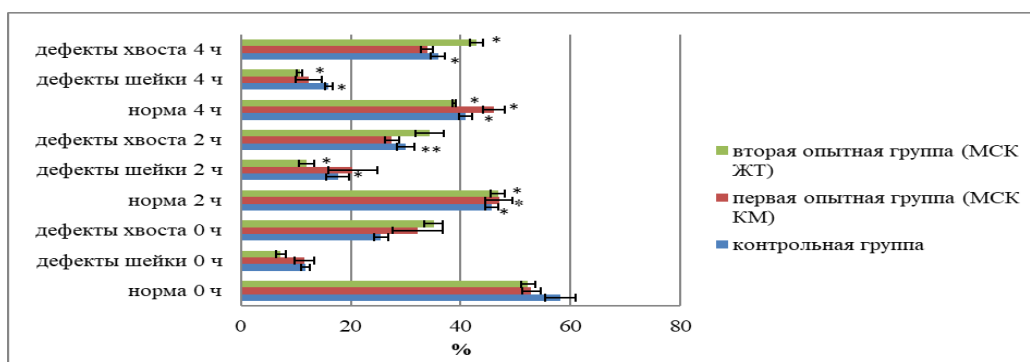


Рисунок 1 – Результаты оценки морфологии сперматозоидов козлов после оттаивания в процессе четырехчасовой инкубации с МСК ($M \pm t$, $n=10$).

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

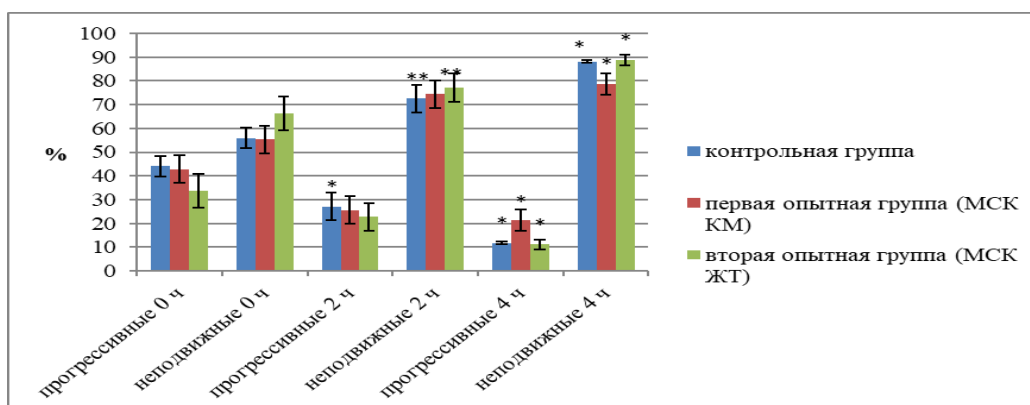


Рисунок 2 – Динамика подвижности сперматозоидов козлов после оттаивания в процессе четырехчасовой инкубации с МСК ($M \pm t$, $n=10$). Примечание: * - $p < 0,01$, ** - $p \leq 0,05$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы).

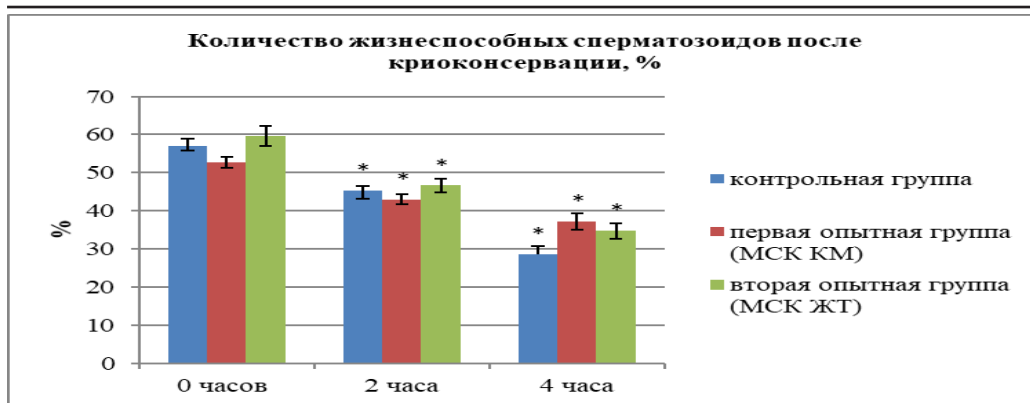


Рисунок 3 – Результаты оценки жизнеспособности сперматозоидов козлов после оттаивания в процессе четырехчасовой инкубации с МСК ($M \pm m$, $n=10$).
Примечание: * - $p < 0,01$, ** - $p \leq 0,05$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы).

Согласно данным рисунка 3, статистически значимое сокращение количества жизнеспособных сперматозоидов козлов в результате 4-х часовой инкубации отмечалось во всех исследуемых группах, однако, наиболее выраженные изменения отмечались в контрольной группе с разницей значений, равной 1,9 раза ($p < 0,01$). Наибольшее количество жизнеспособных сперматозоидов было зарегистрировано в первой опытной группе при 4-х часовой инкубации образцов с МСК, полученных из костного мозга – $37,13 \pm 2,21\%$.

Что касается оценки акросомальной целостности, то наибольшее количество сперматозоидов с интактными акросомами было зарегистрировано во второй опытной группе (МСК ЖТ). Вместе с тем, была зарегистрирована характерная тенденция сокращения количества сперматозоидов с интактными акросомами при внутригрупповом сравнении преимущественно в контрольной и второй опытных группах со следующей достоверной разницей значений: 2 часа инкубации – 1,4 и 1,3 раза ($p < 0,01$), 4 часа инкубации – 1,6 раза ($p < 0,01$). Что касается первой опытной группы, то разница значений между 0, 2 и 0, 4 часов инкубации была следующей – 1,2 и 1,5 раз ($p < 0,01$).

Таким образом, можно предположить, что МСК оказывает регенеративный эффект на структуру сперматозоидов после криоконсервации и обладает протекторным действием.

Полученные данные согласуются с ранее проведенными исследованиями при инкубации спермы баранов-производителей (после оттаивания) с МСК из КМ и ЖТ, и полученными результатами [3] и определяют перспективность дальнейших исследований, в том числе и с целью раскрытия механизма воздействия МСК на структуру сперматозоидов.

ВЫВОДЫ/CONCLUSION

Проведенные нами исследования и полученные результаты указывают на возможность применения МСК из жировой ткани и костного мозга в качестве среды/средового компонента для регенерации сперматозоидов козлов после оттаивания. Стоит отметить, что получение результата достигается после определенной пролонгированной инкубации спермы с мезенхимальными стволовыми клетками. Также наиболее выраженный эффект отмечается при инкубации с МСК из костного мозга. Полученные результаты единогласно подтверждают изложенный факт. Так, при инкубации спермы козлов после оттаивания с МСК из костного мозга в течение 2-4 часов наблюдается:

сохранение морфологически нормальных сперматозоидов, при этом их количество на 4-й час инкубации составляет

46,00±1,98%;

сохранение двигательной активности на 4-й час инкубации, равной 21,45±4,58% с достоверной наименьшей разницей между значениями внутри группы – 2,0 раза ($p < 0,01$);

сперматозоиды козлов сохраняют жизнеспособность с течение 4-х часов инкубации, непосредственно после оттаивания образцов. При этом наибольшее количество жизнеспособных сперматозоидов отмечается при инкубации спермы с МСК из КМ (37,13±2,21%).

EFFICIENCY OF MSC USING AFTER GOAT SPERM CRYOPRESERVATION

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; **Finageev E.Y.**¹ – PhD, In Veterinary science, Assistant, Department of Genetic and Reproductive Technologies, **Glavatskay D.E.**¹ – PhD student, **Pushkina V.S.**¹ – PhD 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 aim of the study was to establish the efficiency of using mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow of goats after sperm cryopreservation. The results of four-hour incubation of sperm samples after thawing indicate a reliable difference in the values during incubation with mesenchymal stem cells (MSCs) from adipose tissue/bone marrow and without them (OptiXcell medium). Thus, during four-hour incubation of sperm after thawing, a statistically significant decrease in the num-

ber of normal spermatozoa was noted in all study groups. At the same time, the difference in values in the control group was 1.3 ($p < 0.01$, 2 hours) and 1.4 ($p < 0.01$, 4 hours) times; the first experimental group - 1.1 ($p < 0.01$, 4 hours) times; the second experimental group - 1.1 ($p < 0.01$, 2 hours) and 1.3 ($p < 0.01$, 4 hours) times compared to the results of 0 hours of incubation. Samples of the control and first experimental groups had the same dynamics of reliable changes in sperm motility during four-hour incubation after thawing – a statistically significant decrease in the number of progressively moving sperm by 1.6 times ($p < 0.05$ – control group, $p < 0.01$ – first experimental group), and, on the contrary, a reliable increase in the number of non-progressively moving sperm by 1.3 times ($p < 0.05$ for both groups). Pronounced motility activity was observed in the sperm of the first experimental group upon completion of 4-hour incubation, equal to 21.45 ± 4.58%. The highest number of viable spermatozoa was registered in the first experimental group with 4-hour incubation of samples with MSC obtained from bone marrow - 37.13±2.21%, the highest number of spermatozoa with intact acrosomes - in the second experimental group (MSC AT). Thus, it can be assumed that MSC has a regenerative effect on the structure of spermatozoa after cryopreservation. To reveal the mechanism of the effect of MSC on the structure of spermatozoa, it is necessary to continue research.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Баженова, Н. Б. Оценка качественных показателей спермы животных: учебно-методическое пособие / Н. Б. Баженова, К. В. Племяшов, Е. А. Корочкина. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2023. – 25 с.
2. ГОСТ 32222–2013. Средства воспроизводства. Сперма. Методы отбора проб. – Введен 2015-01-27. – М.: Стандарт информ, 2018. – 10 с.
3. 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. – DOI 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2024-4-10.
4. Мирошина, Т. А. Перспективы молочного козоводства / Т. А. Мирошина // Проблемы интенсивного развития животноводства и их решение: материалы международной научно-практической конференции, Брянск, 25–26 марта 2021 года. – Брянск: Брянский государственный аграрный университет, 2021. – С. 529-532.
5. Тощев, В.К. Экстерьерные особенности коз белой русской породы и их помесей с зааненскими козлами /В.К. Тощев, Е.В. Царегородцева, Г.Н.Мустафина // Мосоловские чтения. - Йошкар-Ола, 2006. - Вып.8. - С.247-249.
6. Goat Semen Cryopreservation Protocol. // National Animal GermplasmProgram. - 2016. (5)
7. Xu, B. Evaluation of lipidomic change in goat sperm after cryopreservation / Xu B, Wang R, Wang Z, et al. // Frontiers in veterinary science. - 2022.-Vol. 9.- P 1-11. (9)
8. Zhang, W. Beneficial effect of proline supplementation on goat spermatozoa quality during cryopreservation / Zhang Weijing, Lingjiang Min, Yajing Li, et al.// Animals. - 2022. - Vol. 12(19). -P. 1-13.(10)
- REFERENCES**
1. Bazhenova N. B., Plemyashov K. V., Korochkina E. A. Otsenkakachestvennykhpokazateleyspermyzhivotnykh. Sankt-Peterburg: Sankt-Peterburgskiygosudarstvennyyuniversitetvet-erinarnoymeditsiny, 2023. 25 s.
2. GOST 32222–2013.Sredstva vosproizvodstva. Sperma. Metodyotbora prob. – M.: Standart inform. 2018. 10 s.
3. Korochkina, E. A. Influence of mesenchymal stromal cells on the quality of ram sperm after cryopreservation / E. A. Korochkina, V. S. Pushkina // Veterinary science and feeding. - 2024. - No. 4. - P. 55-59. - DOI 10.30917 / ATT-VK-1814-9588-2024-4-10.
4. Miroshina, T. A. Prospects for Dairy Goat Breeding / Т. А. Miroshina // Problems of Intensive Development of Animal Husbandry and Their Solution: Proceedings of the International Scientific and Practical Conference, Bryansk, March 25–26, 2021. – Bryansk: Bryansk State Agrarian University, 2021. – Pp. 529–532.
5. Toshchev, V. K. Exterior Features of White Russian Goats and Their Crosses with Saanen Goats / V. K. Toshchev, E. V. Tsaregorodtseva, G. N. Mustafina // Mosolov Readings. – Yoshkar-Ola, 2006. – Issue 8. – Pp. 247–249.
6. Goat Semen Cryopreservation Protocol. // National Animal GermplasmProgram. - 2016. (5)
7. Xu, B. Evaluation of lipidomic change in goat sperm after cryopreservation / Xu B, Wang R, Wang Z, et al. // Frontiers in veterinary science. - 2022.-Vol. 9.- P 1-11. (9)
8. Zhang, W. Beneficial effect of proline supplementation on goat spermatozoa quality during cryopreservation / Zhang Weijing, Lingjiang Min, Yajing Li, et al.// Animals. - 2022. - Vol. 12(19). -P. 1-13.(10)