

УДК: 576.362:636.2.082.453.52

DOI:10.52419/issn2072-2419.2025.2.338

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ПЕРЕЖИВАЕМОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Корочкина Е.А.^{1*} – д-р ветеринар. наук, доц. каф. генетических и репродуктивных биотехнологий (ORCID0000-0002-7011-4594); Трифонова А.В.² – канд. биол. наук, директор по науке; Бахтурина Е.И.¹ – студ.

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

² ООО «Стэмреновацио»

*e.kora@mail.ru

Ключевые слова: производные мезенхимальных стволовых клеток, сперма, быки-производители.

Keywords: components of mesenchymal stem cell, sperm, bulls.

Поступила: 30.04.2025

Принята к публикации: 06.06.2025

Опубликована онлайн: 20.06.2025

РЕФЕРАТ



Целью исследований явилось изучение влияния производных МСК на переживаемость сперматозоидов быков-производителей. Количество собранных образцов составило 32. После взятия и оценки эякулята, проводили центрифугирование (600 оборотов – 7 минут), далее удаляли семенную плазму и проводили дальнейшее исследование по двум направлениям: 1. инкубация образцов (n=19) с со средой № 1 (кондиционированной средой МСК КМ быков (эксперимент № 1)); 2. инкубация образцов (n=13) со средой № 2 (лизатом МСК КМ быков (эксперимент № 2)). При проведении 1-го эксперимента - инкубации образцов спермы быков-производителей со средой № 1, было зафиксировано непродолжительное время переживаемости (2 часа). При двухчасовой инкубации образцов в данной среде наблюдалось выраженное снижение количества прогрессивно двигающихся сперматозоидов в опытной группе в 2,6 раз ($p \leq 0,05$), в контрольной группе - в 4,7 раза ($p \leq 0,05$) по сравнению с показателями 0 часов инкубации. Достоверное снижение количества нормальных форм сперматозоидов было зарегистрировано при оценке 2-х часовой инкубации спермы в опытной и контрольной группах в 1,1 раз ($p \leq 0,05$). Полученные данные указывают на низкую эффективность применения кондиционированной среды в аспекте улучшения качества спермы. На втором этапе исследований (эксперимент № 2) была проведена оценка эффективности применения среды № 2. При инкубации образцов в данных средах была зафиксирована четырехчасовая переживаемость сперматозоидов, анализ показателей подвижности и морфологии которых указывает на положительное влияние данных производных МСК на функциональную способность клеток, при этом на 4-й час инкубации количество прогрессивно подвижных сперматозоидов составило $41,25 \pm 13,3\%$, количество морфологически нормальных сперматозоидов – $62,13 \pm 2,56\%$.

ВВЕДЕНИЕ/INTRODUCTION

Молочное животноводство является основой продовольственной безопасности нашей страны. Рентабельность данной отрасли во многом зависит от эффективности использования вспомогательных репродуктивных технологий, одним из ключевых факторов успешности применения, которых, является качество спермопродукции производителей и главным образом – срок переживаемости сперматозоидов в половых путях самки. При проведении искусственного осеменения, сперматозоиды быков-производителей перемещаются из матки к верхней трети маточной трубы, где происходит оплодотворение. Процесс транспортировки сперматозоидов сопровождается их взаимодействием с секретом маточных труб, что, безусловно, отражается на функциональной способности мужских половых гамет [7]. Так, согласно данным Mahé С. с соавторами (2021), сперматозоиды в большом количестве задерживаются в перешейке маточной трубы, который является вторым селективным барьером за пределами шейки матки. У коров перешеек маточной трубы характеризуется резким ограничением диаметра матки и наличием складок слизистой оболочки, заполняющих просвет [10]. По данным Druart X. с соавторами (2009), у овец через 4 часа после осеменения наблюдалось большое количество сперматозоидов от основания рогов матки до перешейка маточной трубы и резкое их снижение в маточной трубе. Согласно исследованиям Sumransap P. с соавторами (2007), Tummaruk P. с соавторами (2007), количество сперматозоидов баранов, локализованных в верхней части рога матки составило 42%, в перешейке - только 0,5%. У коров через 18 ч после осеменения в матке было до 20 000 сперматозоидов и только 2000 в перешейке маточной трубы [13]. Что касается качественных показателей сперматозоидов, то у свиней, крыс, мышей и хомяков в нижней части маточной трубы были обнаружены только живые [3], подвижные, морфологически нормальные [9] сперматозоиды, а также сперматозои-

ды, имеющие неповрежденную акросому [10]. Принимая во внимание вышеизложенные факты, а также особенности проведения искусственного осеменения, актуальным является разработка сред, увеличивающих длительность переживаемости сперматозоидов производителей, находящихся в половых путях самки. Результаты, полученные в области клеточной биологии, указывают на перспективность применения производных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) - кондиционированной среды (КС) и лизата (КР) в репродуктивной медицине [2]. В связи с этим, целью исследований явилось изучение влияния производных МСК на срок переживаемости сперматозоидов быков-производителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Работу выполняли в научно-образовательной лаборатории ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины». Сперму получали от двух половозрелых быков (1,5 года) голштинской породы с помощью искусственной вагины IMV (Франция). После взятия и оценки эякулята (n=32), образцы центрифугировали (600 оборотов – 7 минут), удаляли семенную плазму и проводили дальнейшее исследование по двум направлениям: 1. инкубация образцов (n=19) с кондиционированной средой МСК КМ быков (эксперимент № 1); 2. инкубация образцов (n=13) с лизатом МСК КМ быков (эксперимент № 2) [1].

При оценке качества спермы проводили исследование следующих показателей: концентрации и подвижности (с помощью камеры Маклера, увеличение 10x10, предварительно образцы разводили 1:100). Степень подвижности оценивали по следующим критериям: прогрессивная, медленная прогрессивная, непрогрессивная, неподвижные (согласно протоколу 6-го издания ВОЗ (2021)). Морфологию гамет определяли согласно критериям Крюгера, в качестве красителя использовали набор SpermBlue (Microptic, 100x10, иммерсионное масло).

Жировую ткань (ЖТ) и костный мозг (КМ) получали после седации диазепамом (0.05 мг/кг внутривенно) и местной анестезии 2%-ным гидрохлоридом лидокаина у здоровых коров возрастом 1-2 года в хозяйстве Ленинградской области.

Пункцию КМ (3 см3) брали после асептической подготовки кожи при помощи иглы для биопсии из подвздошной кости и переносили в стерильную пробирку с гепарином. Пробирки с биоматериалом доставляли в лабораторию при 4–8°C в течение 2 часов.

В лаборатории отдела разработки клеточных биотехнологий ООО «Стэм реновацио» биоматериал обрабатывали. Для проведения экспериментов по влиянию компонентов МСК на сохранность и поддержание качества спермы быков, клетки деконсервировали и культивировали в среде «MEM + 10 % FBS. Начиная с 3-го пассажа после размораживания, их использовали в работе.

Кондиционированную среду (КС) отбирали через 96 ч культивирования в матрасах с 90-100% монослоем клеток.

Для получения лизата МСК клетки культивировали в течение 96 ч до формирования 90-100%, снимали при помощи 0,05%-ного раствора трипсина в растворе Версена (ПанЭко, Россия), отмывали от диспергирующего раствора при помощи раствора PBS, считали в камере Горяева, готовили суспензию клеток в PBS с концентрацией МСК $2 \cdot 10^7$ кл/мл, фасовали в криопробирки по 100 мкл. Лизат МСК получали при помощи двукратной быстрой заморозки до -196°C – медленного оттаивания при комнатной температуре в течение 20 минут. Финальное оттаивание производили непосредственно перед добавлением к сперматозоидам.

При проведении эксперимента №1 было сформировано две группы проб по 19 образцов в каждой (n=19): контрольная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл + фосфатно-солевой буфер (PBS) 100 мкл), опытная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл) + среда №1 (кондиционированная среда (КС) МСК КМ в соотношении 1:1)). При про-

ведении эксперимента №2 - две группы проб по 13 образцов в каждой (n=13): контрольная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл + фосфатно-солевой буфер (PBS) 100 мкл), опытная (сперматозоиды 7×10^8 кл/мл) + среда №2 (лизат (КР) МСК КМ в соотношении 1:1). С целью установления степени переживаемости сперматозоидов в средах, содержащих производные МСК (КС и КР), была проведена трёхэтапная оценка качества спермы: 0, 2 и 4 часа после инкубации при температуре 38°C. Сравнение значений производилось на каждом этапе инкубации (0, 2 и 4 часа) внутри каждой группы. При этом достоверными считались различия при $p \leq 0,05$. Статистическая обработка данных была проведена при помощи программы Stattech и Medstatistic «Медицинская Статистика» с вычислением показателей вариационного ряда и t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Как известно, МСК это мультипотентные стромальные клетки, присутствующие во всех органах и тканях живого организма, способные дифференцироваться в различные типы клеток и участвовать в процессе регенерации. МСК и их производные имеют противовоспалительные свойства, способствуют формированию новых сосудистых сетей, эпителизации раневой поверхности, стимулированию к репарации резидентных стволовых клеток в месте повреждения. Кроме того, установлена способность МСК вызывать подавление образования активных форм кислорода и активных форм азота, а также переноса здоровых митохондрий в повреждённые клетки [2].

На первом этапе исследований (эксперимент № 1) была проведена оценка эффективности применения среды № 1 (кондиционированной среды МСК) в аспекте сохранения функциональной способности сперматозоидов. Результаты исследования отражены на рисунках 1 и 2.

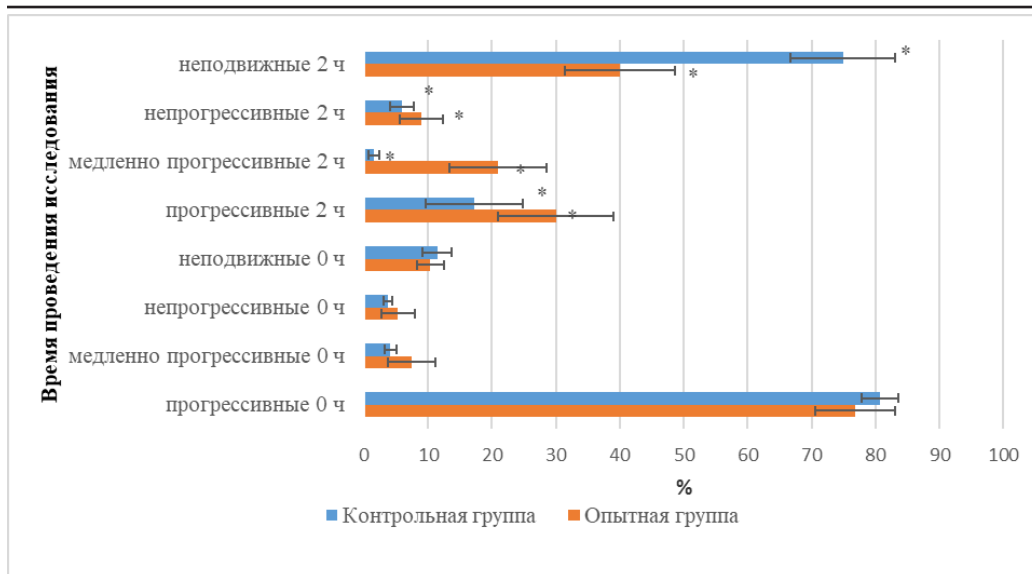


Рисунок 1 – Динамика прогрессивности движений сперматозоидов быков-производителей в процессе двухчасовой инкубации со средой № 1 ($M \pm m$, $n=19$).
Примечание: * - $p \leq 0,05$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы).

При проведении инкубации образцов спермы быков-производителей со средой № 1, было зафиксировано непродолжительное время переживаемости сперматозоидов (2 часа).

Результаты анализа двигательной активности сперматозоидов при двухчасовой инкубации в кондиционированных средах МСК указывают на выраженное снижение количества прогрессивно двигающихся сперматозоидов в опытной группе в 2,6 раз ($p \leq 0,05$), в контрольной группе - в 4,7 раза ($p \leq 0,05$) по сравнению с показателями 0 часов инкубации. Было зарегистрировано увеличение количества медленно прогрессивно двигающихся сперматозоидов в опытной группе в 2,8 раз ($p \leq 0,05$) и, напротив, уменьшение количественного значения данного показателя в контрольной группе (2,8 раз, $p \leq 0,05$). Наблюдалось увеличение количества непрогрессивно двигающихся сперматозоидов в опытной и контрольной группах на 2-й час инкубации в 2,8 раз ($p \leq 0,05$), а также выраженное увеличение количества неподвижных сперматозоидов в опытной и контрольной группах в 3,9 и

6,6 раз ($p \leq 0,05$) соответственно.

Результаты оценки морфологической структуры сперматозоидов отражены на рисунке 2.

Согласно данным рисунка 2, снижение количества нормальных форм сперматозоидов было зарегистрировано при оценке 2-х часовой инкубации спермы в опытной и контрольной группах в 1,1 раз. Наиболее выраженные изменения морфологической структуры сперматозоидов были зафиксированы при оценке целостности хвостовой части. Так, наблюдалось увеличение сперматозоидов с дефектами хвоста на 2-й час инкубации в опытной группе в 1,2 раз, в контрольной группе – в 1,1 раз по сравнению с показателями 0 часов инкубации. Таким образом, полученные данные указывают на низкую эффективность применения кондиционированной среды в аспекте улучшения качества спермы.

На втором этапе исследований (эксперимент № 2) была проведена оценка эффективности применения среды № 2 (лизат МСК), результаты отражены на рисунках 3-4. При инкубации образцов в

средах, содержащих лизат МСК была зафиксирована четырехчасовая переживаемость сперматозоидов, анализ показателей подвижности и морфологии которых указывает на положительное влияние данных производных МСК на функциональную способность клеток (рисунок 3).

Так, было установлено достоверное уменьшение количества прогрессивно двигающихся сперматозоидов в контрольной и опытной группах на 2-й час инкубации в 6,2 ($p \leq 0,05$) и 2,5 ($p \leq 0,05$) раз соответственно по сравнению с показателями 0 часов инкубации. Данная тен-

денция была зарегистрирована на 4-й час инкубации в образцах опытной группы с разницей значений в 2,0 раз ($p \leq 0,05$).

Что касается динамики количества медленно прогрессивных сперматозоидов, то увеличение значений отмечалось на 2-й час инкубации в опытной и контрольной группе в 1,03 и 6,0 ($p \leq 0,05$) раз соответственно по сравнению со значениями 0 часов. Далее, на 4-й час инкубации было зафиксировано уменьшение значения данного показателя преимущественно в опытной группе в 1,4 раз ($p \leq 0,05$).

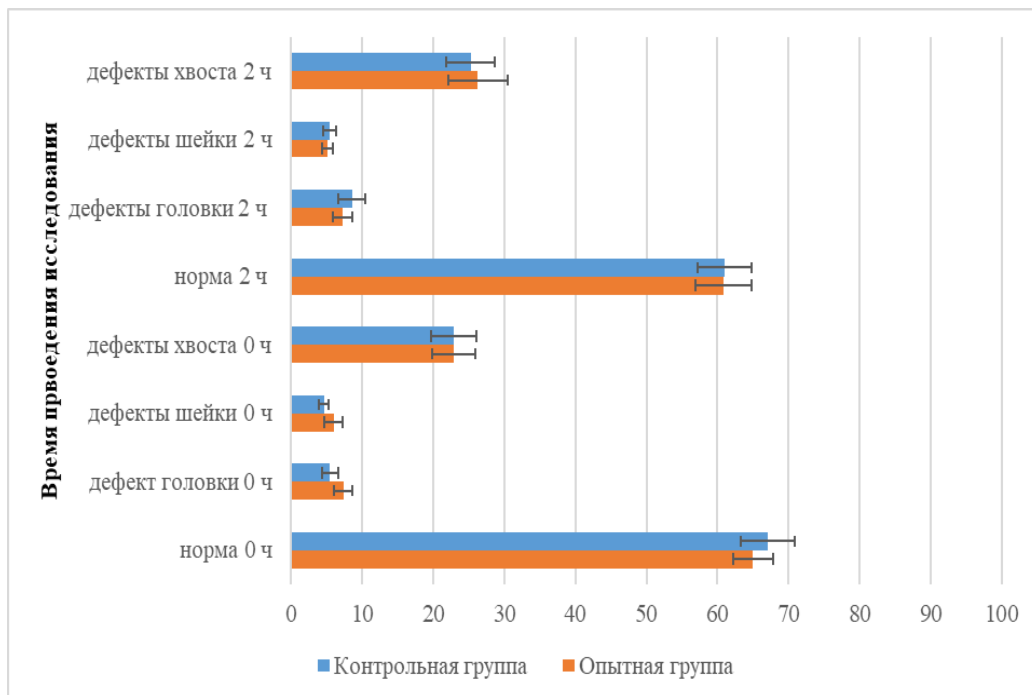


Рисунок 2 – Результаты оценки морфологии сперматозоидов быков-производителей в процессе двухчасовой инкубации со средой № 1 ($M \pm t$, $n=19$).

При анализе результатов оценки морфологической структуры сперматозоидов была зафиксирована тенденция к увеличению количества морфологически нормальных клеток в процессе 4-х часовой инкубации в средах, содержащих лизат МСК в 1,03 и 1,1 ($p \leq 0,05$) раз по сравнению с результатами 0 часов инкубации

(рисунок 4).

Было зарегистрировано уменьшение количества сперматозоидов с дефектами головки и хвоста в опытной группе на 4-й час инкубации в 1,3 ($p \leq 0,05$) и 1,1 раз по сравнению с результатами, полученными при оценке 0 часов инкубации. Что касается контрольной группы, то на 4-й час

инкубации отмечалась тенденция к снижению количества нормальных сперматозоидов в 1,1 ($p \leq 0,05$) раз, увеличение сперматозоидов с дефектами головки – в 1,1 раз, с дефектами хвоста – в 1,3 ($p \leq 0,05$) раз.

Таким образом, полученные результаты указывают на выраженный положительный эффект применения компонента МСК – лизата по сравнению с кондиционированной средой. При этом, нужно отметить, что ключевым механизмом, лежащим в основе терапевтического действия МСК и их производных, является паракринное действие их секреторных компонентов, межклеточный транспорт митохондрий и обмен внеклеточными везикулами, содержащими микроРНК, липиды и метаболиты [9].

Согласно исследованиям Rogulska O. (2024), трофические факторы и воспалительные модуляторы, высвобождаемые МСК, демонстрирует мощную терапевтическую эффективность в многочисленных

доклинических моделях и клинических испытаниях. По данным Kavalldzhieva K. (2025), факторами роста, секретируемыми МСК, которые поддерживают ангиогенез и заживление ран, являются основной фактор роста фибробластов (bFGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста тромбоцитов (PDGF), ангиопоэтин 1 (ANG-1), фактор роста плаценты (PIGF), интерлейкин 6 (IL-6) и моноцитарный хемоаттрактантный белок 1 (MCP-1). Установлены также антиоксидантные свойства секрета МСК, в частности высвобождая глутатион, HGF, IL-12 и S-трансферазы Р, МСК помогают противостоять окислительному стрессу в поврежденных тканях.

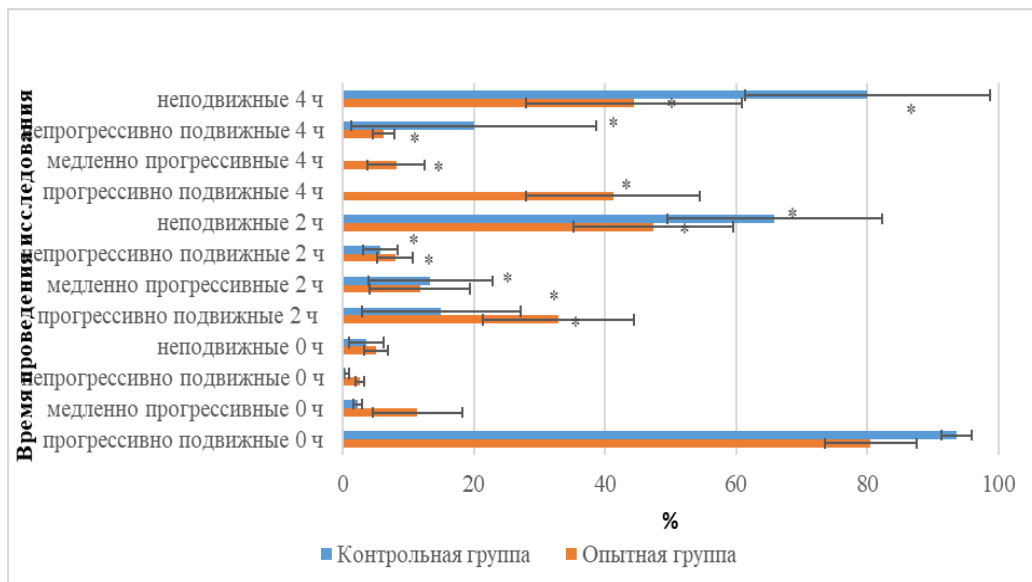


Рисунок 3 – Результаты оценки подвижности сперматозоидов быков-производителей в процессе четырехчасовой инкубации со средой № 2 ($M \pm m$, $n=13$).
Примечание: * - $p \leq 0,05$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы)

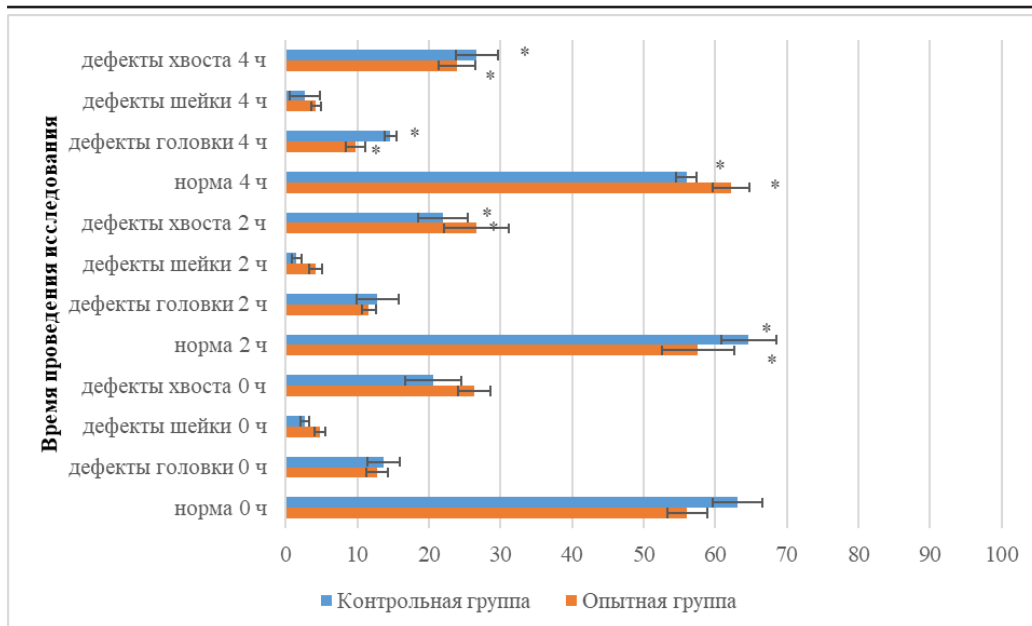


Рисунок 4 – Результаты оценки морфологии сперматозоидов быков-производителей в процессе четырёхчасовой инкубации со средой № 2 ($M \pm m$, $n=13$).

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

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Таким образом, полученные результаты указывают на возможность применения сред, содержащих производные МСК, для сохранения переживаемости сперматозоидов в половых путях самки. При этом эффективным является использование лизата МСК, полученного из костного мозга быков. Так, четырехчасовая инкубация образцов в средах, содержащих данный компонент МСК способствует сохранению двигательной активности сперматозоидов, при этом на 4-й час инкубации количество прогрессивно подвижных сперматозоидов составило $41,25 \pm 13,3\%$, количество морфологически нормальных сперматозоидов – $62,13 \pm 2,56\%$. Что касается эффективности инкубации сперматозоидов в кондиционированных средах МСК, то продолжительность переживаемости сперматозоидов составила 2 часа, при этом количество прогрессивно подвижных сперматозоидов было $30,00 \pm 9,0\%$, количество морфологически нормальных сперматозои-

дов – $66,33 \pm 4,55\%$. Учитывая полученные данные, актуальным является изучение регенеративного действия производных МСК, в частности лизата, на переживаемость сперматозоидов после оттаивания.

THE INFLUENCE OF COMPONENT MESENCHYMAL STEM CELLS ON THE QUALITY OF BULLS' SPERM

Korochkina E.A. ^{1*} – PhD. In Veterinary science, Associate Professor, Department of Genetic and Reproductive Technologies (ORCID0000-0002-7011-4594); **Trifonova A.V.** ² – PhD in biological science, the director of science; **Bachturina E.I.** ¹ – student.

¹ St. Petersburg state academy of veterinary medicine

² LLC "Scientific Center for Cytogenetic Testing"

*e.kora@mail.ru

ABSTRACT

The aim of the study was a comparative

analysis of the effect of conditioned medium and lysate on the qualitative parameters of bull sperm. The number of collected samples was 32. After collecting and evaluating the ejaculate, centrifugation was performed (600 rpm - 7 minutes), then the seminal plasma was removed and further research was carried out in two directions: 1. incubation of samples ($n = 19$) with 1st extender (conditioned medium of bull BM MSCs (experiment No. 1)); 2. incubation of samples ($n = 13$) with 2d extender (lysate of bull BM MSCs (experiment No. 2)). During the 1st experiment - incubation of bull sperm samples with 1st extender, a short survival time (2 hours) was recorded. During two-hour incubation of samples in conditioned media of MSCs, a significant decrease in the number of progressively moving spermatozoa was observed in the experimental group by 2.6 times ($p \leq 0.05$), in the control group - by 4.7 times ($p \leq 0.05$) compared to the values of 0 hours of incubation. A reliable decrease in the number of normal forms of spermatozoa was recorded when evaluating a 2-hour incubation of sperm in the experimental and control groups by 1.1 times ($p \leq 0.05$). The obtained data indicate low efficiency of using conditioned medium in terms of improving sperm quality. At the second stage of the study (experiment No. 2), the efficiency of using MSCs lysate was assessed. When incubating samples in 2d extender, a four-hour survival of spermatozoa was recorded, the analysis of motility and morphology indicators of which indicates a positive effect of these MSC derivatives on the functional capacity of cells, while at the 4th hour of incubation the number of progressively motile spermatozoa was $41.25 \pm 13.3\%$, the number of morphologically normal spermatozoa was $62.13 \pm 2.56\%$.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Корочкина Е. А. Перспективы применения производного мезенхимальных стволовых клеток как способа повышения качества спермы быков-производителей / Е. А. Корочкина, А. В. Трифонова, В. В. Никитин [и др.] // Международный вестник ветеринарии. – 2024. – № 4. – С. 486-

492. – DOI 10.52419/issn2072-2419.2024.4.486. – EDNEJLIYU.
2. Чапленко А.А. Актуальные направления применения клеточной терапии в регенеративной медицине / А.А. Чапленко, М.Д. Хорольский, Е.В. Мельникова, В.А. Меркулов // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. -2020. - 20(2) – С. 82-88. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-82-88>
3. Baker RD. Transport of live and dead boar spermatozoa within the reproductive tract of gilts / R.D. Baker, A.A. Degen// Reproduction. - 1972; 28:369–377.(20)
4. Druart X. In vivo imaging of in situ motility of fresh and liquid stored ram spermatozoa in the ewe genital tract / X. Druart, J. Cognié, G. Baril, F. Clément, J-L. Dacheux, J-L. Gatti // Reproduction 2009; 138:45–53. (16)
5. Kavalzhieva, K.; Mladenov, N.; Markova, M.; Belemezova, K. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Potential Applications in Human Infertility Caused by Hormonal Imbalance, External Damage, or Immune Factors. Biomedicines 2025, 13, 586. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13030586>
6. Mahé C. Sperm migration, selection, survival, and fertilizing ability in the mammalian oviduct / C. Mahé, A.M. Zlotkowska, K. Reynaud, G. Tsikis, P. Mermillod, X. Druart, J. Schoen, M. Saint-Dizier // Biol Reprod.- 2021.- Aug 3;105(2):317-331. doi: 10.1093/biolre/ioab105. PMID: 34057175; PMCID: PMC8335357.
7. Miller DJ. Review: The epic journey of sperm through the female reproductive tract. animal. 2018;12(s1):s110-s120. doi:10.1017/S1751731118000526
8. Muro Y. Behavior of mouse spermatozoa in the female reproductive tract from soon after mating to the beginning of Fertilization / Y. Muro, H. Hasuwa, A. Isotani, H. Miyata, K.Yamagata, M. Ikawa, R. Yanagimachi, M.Okabe // Biol Reprod. - 2016; 94:80.
9. Muro Y, Hasuwa H, Isotani A, Miyata H, Yamagata K, Ikawa M, Yanagimachi R, Okabe M. Behavior of mouse spermatozoa in the female reproductive tract from soon after mating to the beginning of Fertiliza-

- tion / Y Muro, H. Hasuwa, A. Isotani, H. Miyata, K. Yamagata, M. Ikawa, R. Yanagimachi, M. Okabe // *Biol Reprod* 2016; 94:80.
 10. Rogulska, O., Vackova, I., Prazak, S. et al. Storage conditions affect the composition of the lyophilized secretome of multipotent mesenchymal stromal cells. *Sci Rep* 14, 10243 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60787-z>
 11. Suarez S.S. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* 2008; 52:455–462. (15)
 12. Sumransap P. Sperm distribution in the reproductive tract of sows after intrauterine insemination / P. Sumransap, P. Tummaruk, A. Kunavongkrit // *Reprod Domest Anim.* - 2007; 42:113–117.
 13. Suprayogi T.W. Utilization of bull fertility-associated antigen to improve the quality of frozen bull semen / T.W. Suprayogi, H. Hardijanto, M. Hariadi, F.A. Rantam, W. Darmanto // *Vet World.* -2020 Oct;13 (10):2112-2117. doi: 10.14202/vetworld.2020.2112-2117.
 14. Tummaruk P. Distribution of spermatozoa and embryos in the female reproductive tract after unilateral deep intra uterine insemination in the pig / P. Tummaruk, P. Sumransap, M. Techakumphu, A. Kunavongkrit // *Reprod Domest Anim.* - 2007; 42:603–609.
- REFERENCES**
1. Korochkina E. A. Prospects for the use of a mesenchymal stem cell derivative as a way to improve the quality of sperm of breeding bulls / E. A. Korochkina, A. V. Trifonova, V. V. Nikitin [et al.] // *International Bulletin of Veterinary Medicine.* - 2024. - No. 4. - P. 486-492.- DOI 10.52419/issn2072-2419.2024.4.486.- EDN EJLIYU.
 2. Chaplenko A. A. Current areas of application of cell therapy in regenerative medicine / A. A. Chaplenko, M. D. Khorolsky, E. V. Melnikova, V. A. Merkulov // *BIOpreparations. Prevention, diagnostics, treatment.* - 2020.- 20(2) – P. 82-88. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-82-88>
 3. Baker RD. Transport of live and dead boar spermatozoa within the reproductive tract of gilts / R.D. Baker, A.A. Degen// *Reproduction.* - 1972; 28:369–377.(20)
 - 4.Druart X. In vivo imaging of in situ motility of fresh and liquid stored ram spermatozoa in the ewe genital tract / X. Druart, J. Cognié, G. Baril, F. Clément, J-L. Dacheux, J-L. Gatti // *Reproduction* 2009; 138:45–53. (16)
 5. Kavalzhieva, K.; Mladenov, N.; Markova, M.; Belemezova, K. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Potential Applications in Human Infertility Caused by Hormonal Imbalance, External Damage, or Immune Factors. *Biomedicines* 2025, 13, 586. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13030586>
 6. Mahé C. Sperm migration, selection, survival, and fertilizing ability in the mammalian oviduct / C. Mahé, A.M. Zlotkowska, K. Reynaud, G. Tsikis, P. Mermillod, X. Druart, J. Schoen, M. Saint-Dizier // *Biol Reprod.* - 2021.- Aug 3;105(2):317-331. doi: 10.1093/biolre/iob105. PMID: 34057175; PMCID: PMC8335357.
 - 7.Miller DJ. Review: The epic journey of sperm through the female reproductive tract. *animal.* 2018;12(s1):s110-s120. doi:10.1017/S1751731118000526
 - 8.Muro Y. Behavior of mouse spermatozoa in the female reproductive tract from soon after mating to the beginning of Fertilization / Y. Muro, H. Hasuwa, A. Isotani, H. Miyata, K.Yamagata, M. Ikawa, R. Yanagimachi, M.Okabe // *Biol Reprod.* - 2016; 94:80.
 - 9.Muro Y, Hasuwa H, Isotani A, Miyata H, Yamagata K, Ikawa M, Yanagimachi R, Okabe M. Behavior of mouse spermatozoa in the female reproductive tract from soon after mating to the beginning of Fertilization / Y Muro, H. Hasuwa, A. Isotani, H. Miyata, K. Yamagata, M. Ikawa, R. Yanagimachi, M. Okabe // *Biol Reprod* 2016; 94:80.
 10. Rogulska, O., Vackova, I., Prazak, S. et al. Storage conditions affect the composition of the lyophilized secretome of multipotent mesenchymal stromal cells. *Sci Rep* 14, 10243 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60787-z>
 11. Suarez S.S. Regulation of sperm storage

- and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* 2008; 52:455–462. (15)
12. Sumransap P. Sperm distribution in the reproductive tract of sows after intrauterine insemination / P. Sumransap, P. Tummaruk, A. Kunavongkrit // *Reprod Domest Anim.* - 2007; 42:113–117.
13. Suprayogi T.W. Utilization of bull fertility-associated antigen to improve the quality of frozen bull semen / T.W. Suprayogi, H. Hardijanto, M. Hariadi, F.A. Rantam, W. Darmanto // *Vet World.* -2020 Oct;13 (10):2112-2117. doi: 10.14202/vetworld.2020.2112-2117.
14. Tummaruk P. Distribution of spermatozoa and embryos in the female reproductive tract after unilateral deep intra uterine insemination in the pig / P. Tummaruk, P. Sumransap, M. Techakumphu, A. Kunavongkrit // *Reprod Domest Anim.* - 2007; 42:603–609.