



DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-4-354-362  
УДК 576.32/.36:636.082.453.53



# Влияние мезенхимных стволовых клеток на сперму животных при хранении

Е. Ю. Закирова, А. Г. Маланьева, А. М. Аймалетдинов

Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (ИФМиБ КФУ), г. Казань, Республика Татарстан, Россия

## РЕЗЮМЕ

Мезенхимные стволовые клетки известны человечеству с середины XX в. В ходе проведенного всестороннего изучения выявлен их высокий биологически активный потенциал. Показана возможность образовывать несколько видов тканей организма. Стволовые клетки, как и любые другие, оказывают свое воздействие на окружающие клетки и ткани путем выделения внеклеточных везикул. Внеклеточные везикулы стволовых клеток обладают биологической активностью родительских клеток. Принимая во внимание регенеративный потенциал мезенхимных стволовых клеток, в настоящее время их применяют в медицине, а также в ветеринарии для лечения различных травм животных-компаньонов. Были проведены исследования по изучению влияния мезенхимных стволовых клеток на сперматозоиды хряка и крысы при хранении в течение 12 ч. Согласно полученным результатам, мезенхимные стволовые клетки свиньи способствуют выживанию сперматозоидов хряка и сохранению их подвижности на 60–80% (в зависимости от растворителя) по сравнению с контролем в течение 12 ч соинкубирования. Однако такого значительного эффекта не наблюдали при соинкубировании сперматозоидов крыс с мезенхимными стволовыми клетками крысы. Но необходимо отметить, что до 3-го ч соинкубирования подвижность сперматозоидов в опыте была выше, чем в контроле. К 5-му ч наблюдения эта разница нивелировалась. Вероятно, сперматозоиды крысы и хряка имеют различные физиологические особенности, которые отразились на полученных результатах. Таким образом, показана возможность использования мезенхимных стволовых клеток для хранения и, возможно, криоконсервации спермы некоторых животных, но для этого требуется проведение дальнейших исследований.

**Ключевые слова:** мезенхимные стволовые клетки, свинья, хряк, крыса, сперматозоиды

**Благодарности:** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00172 в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета («Приоритет-2030»).

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Закирова Е. Ю., Маланьева А. Г., Аймалетдинов А. М. Влияние мезенхимных стволовых клеток на сперму животных при хранении. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (4): 354–362. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-4-354-362.

**Для корреспонденции:** Закирова Елена Юрьевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий научно-исследовательской лабораторией «Регенеративная ветеринария» ИФМиБ КФУ, 420008, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, e-mail: lenahamzina@yandex.ru.

## Effect of mesenchymal stem cells on animal semen during storage

E. Yu. Zakirova, A. G. Malanyeva, A. M. Aimaletdinov

Institute of Fundamental Medicine and Biology Kazan (Volga region) Federal University (IFMB KFU), Kazan, Republic of Tatarstan, Russia

## SUMMARY

Mesenchymal stem cells (MSCs) have been known to mankind since the mid-20<sup>th</sup> century. The comprehensive study revealed their high biologically active potential. Capacity of forming several types of body tissues was demonstrated. The stem cells, like any other cells, exert their effect on surrounding cells and tissues by secreting extracellular vesicles. The extracellular vesicles of the stem cells possess biological activity of parent cells. Taking into account the regenerative potential of the mesenchymal stem cells, they are currently used in medicine, and also in veterinary medicine for treatment of various injuries of the companion animals. Effect of the mesenchymal stem cells on boar and rat sperm cells during 12-hour storage was studied. The study results demonstrated that during 12 hours of coincubation, the porcine MSCs contributed to the survival of the boar sperm cells and maintenance of their motility at 60–80% (depending on the solvent) as compared to the controls. Such a significant effect was not however observed during coincubation of the rat sperm cells with rat MSCs. But it should be noted that before the 3<sup>rd</sup> hour of coincubation, the experimental sperm motility was higher than that of the control. By hour 5 of the observation, this difference was leveled. The rat and boar sperm cells are likely to have different physiological characteristics, which were reflected in the results obtained. Therefore, possibility of using the MSCs for the storage and cryopreservation of the semen of some animals was demonstrated, but this requires further research.

**Keywords:** mesenchymal stem cells (MSCs), pig, boar, rat, sperm cells

**Acknowledgements:** The study was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation No. 23-26-00172 within the framework of the Strategic Academic Leadership Program of Kazan Federal University ("Priority-2030").

© Закирова Е. Ю., Маланьева А. Г., Аймалетдинов А. М., 2023

**For citation:** Zakirova E. Yu., Malanyeva A. G., Aimaletdinov A. M. Effect of mesenchymal stem cells on animal semen during storage. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (4): 354–362. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-4-354-362.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**For correspondence:** Elena Yu. Zakirova, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Head of Research Laboratory for Veterinary Regenerative Medicine, IFMB KFU, 420008, Russia, Republic of Tatarstan, Kazan, ul. Kremlevskaya, 18, e-mail: lenahamzina@yandex.ru.

## ВВЕДЕНИЕ

В сельском хозяйстве среди различных практических проблем зоотехнии одной из наиболее актуальных является повышение эффективности воспроизводства стада путем максимального использования высокоценных племенных производителей. Это имеет большое значение для обеспечения дальнейшего прогресса в животноводстве. Важное направление улучшения репродукции – применение искусственного осеменения. Искусственное осеменение является высокоэффективным методом улучшения породных и продуктивных качеств животных путем использования высокоценных племенных производителей. Одним из определяющих факторов результативности искусственного осеменения является совершенствование методов хранения спермы животных в охлажденном или глубоком замороженном состоянии. Однако при технологической обработке спермы, разбавлении ее синтетическими средами и хранении в охлажденном или глубоком замороженном состоянии происходят значительные структурные и физиологические повреждения сперматозоидов. Это приводит к нарушению проницаемости плазматических мембран и выходу из сперматозоидов ряда ферментов и других компонентов клеточного метаболизма, в результате чего значительно снижается фертильность спермы [1]. Причины снижения фертильности охлажденной и замороженной спермы хряков до настоящего времени окончательно не выяснены. Одной из них является активизация процессов перекисного окисления липидов. В процессе хранения сперматозоидов в охлажденном состоянии в них может происходить накопление супероксидных радикалов, являющихся предшественниками высокоактивных кислородных радикалов. Их образование приводит к повреждению ДНК, белков, липидов цитоплазматической мембраны сперматозоида и т. д. В этой связи проводятся исследования по повышению защитных свойств синтетических разбавителей для спермы конкретного вида животных путем введения в их состав различных натуральных или синтетических антиоксидантов, а также других биологически активных веществ [2].

Разработка технологий хранения спермы вне живого организма открывает новые возможности при ее использовании в репродуктивной ветеринарии. Особенно это актуально при искусственном оплодотворении в свиноводстве [3]. Применение этого метода позволяет получить образец спермы заранее в любое удобное время, а также в случае необходимости осуществлять безопасную транспортировку. Основной целью в разработке технологий хранения спермы является увеличение длительности хранения без существенной потери фертильности [4].

Сохранение спермы крыс также имеет большое значение в биологии. Лабораторные крысы используются в биомедицинских исследованиях уже более 170 лет. По многим причинам крысам отдают предпочтение перед мышами в исследованиях физиологии, нейробиологии, фармакологии и поведения. Крыса является основной модельной системой для фармацевтической промышленности из-за сходства с людьми в отношении связывания лекарств и токсикологических профилей, и почти каждое новое лекарство проходит тестирование на этих животных [5]. Это обуславливается тем, что крысы и люди имеют общие геномные области, вследствие чего, например, рак молочной железы у крыс чувствителен к гормонам и имеет большее сходство в стадиях болезни с человеческим, чем мышинный. Вспомогательные репродуктивные технологии и технология редактирования генома облегчили создание генетически модифицированных крыс во всем мире. Технология редактирования генома повысила ценность лабораторных крыс как важных моделей болезней человека и разработки лекарств в физиологии и токсикологии. Однако не все вновь выведенные породы крыс могут размножаться естественным путем. Часто для разведения таких животных проводят экстракорпоральное оплодотворение. Поэтому длительное сохранение жизнеспособности сперматозоидов крыс вне организма актуально [6].

В качестве биологически активных веществ, защищающих сперматозоиды от повреждений, могут выступать стволовые клетки и их производные. Открытие стволовых клеток и изучение их свойств расширило не только знания в клеточной биологии, но и возможности медицины [7, 8]. Было показано, что мезенхимные стволовые клетки (МСК) взрослого организма не являются канцерогенными, неиммуногенными и могут использоваться для стимуляции регенерации поврежденных тканей. Наиболее простым и наименее травматичным способом получения МСК является их получение из жировой ткани [9, 10]. Свой терапевтический эффект МСК опосредуют путем выделения в окружающую среду биологически активных молекул, которые «упакованы» в микровезикулы (МВ). В свою очередь, МВ представляют собой мембранные пузырьки, прикрепление или интернализация которых к клеткам-мишеням приводит к широкому спектру эпигенетических и фенотипических изменений в них. Подобная регуляция физиологических и патологических процессов демонстрирует многообещающие не клеточные терапевтические возможности МВ. Межклеточная связь посредством секреции везикул в настоящее время считается обычным явлением во всех клетках млекопитающих [11, 12].

Ряд исследований показали, что МСК всех животных обладают схожей биологической активностью,

в результате чего они нашли свое применение и в ветеринарии [13, 14, 15]. В настоящее время МСК успешно применяются для лечения различных патологических состояний животных [16, 17].

Изучение возможности использования МСК и их производных в репродуктивных ветеринарных технологиях началось относительно недавно. Проведенными исследованиями установлено, что добавление МСК, выделенных из жировой ткани, в криосреду увеличивает процент жизнеспособных и подвижных сперматозоидов собак после криоконсервации по сравнению с замораживанием без МСК [18]. Согласно литературным данным, ряд исследователей получили хорошие результаты при добавлении кондиционированной среды от МСК амниотического происхождения в криосреду. При этом они показали, что эта добавка усиливала подвижность и жизнеспособность сперматозоидов, целостность мембран и митохондриальную активность сперматозоидов собаки после разморозки. Скорее всего, этот эффект был опосредован естественными МВ, которые содержатся в большом количестве в кондиционированной среде при культивировании клеток [19].

Исходя из всего вышесказанного, провели изучение влияния МСК жирового происхождения на сперматозоиды животных. В настоящей работе представляем результаты хранения спермы хряка и крысы в присутствии МСК этих животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Получение культуры МСК жировой ткани и ее анализ.* У крыс ( $n = 3$ ) забор подкожной жировой ткани производили после декапитации с целью избежать влияния наркотизирующего средства на ход и результаты эксперимента. Место разреза на животе животного выбривали, обрабатывали спиртом кожу. Разрез кожи проводили стерильными хирургическими инструментами по средней линии живота. Затем производили забор подкожно-жировой клетчатки в стерильный контейнер с физиологическим раствором («ПанЭко», Россия) с добавлением 1% пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия).

Забор фрагмента подкожной жировой ткани у свиней ( $n = 3$ ) проходил в стерильный контейнер под общей анестезией в условиях ветеринарной операционной.

Транспортировку образцов жировой ткани осуществляли при температуре не выше 15 °C в течение 2–4 ч после их получения. Выделяли клетки в стерильных условиях клеточной лаборатории по стандартной методике, описанной ранее [20]. Выделение стромально-васкулярной фракции, содержащей стволовые клетки, проводили следующим образом: жировую ткань механически измельчали стерильными ножницами на фрагменты объемом около 1 мм<sup>3</sup> и инкубировали в растворе коллагеназы краба («БиолоТ», Россия) в конечной концентрации 0,2% в течение 1 ч при температуре 37 °C при покачивании на шейкере. Полученную суспензию клеток осаждали путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли. Затем осевшие клетки отмывали: трижды осадок ресуспендировали в 0,9%-м растворе NaCl («ПанЭко», Россия) и осаждали, центрифугируя при 1500 об/мин в течение 10 мин. Полученные клетки культивировали в среде  $\alpha$ -MEM («Пан-Эко», Россия), содержащей 10% сыворотки крови плодов коров –

FBS («ПанЭко», Россия), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин («Пан-Эко», Россия). Через 24 ч питательную среду заменяли на свежую ростовую среду. При этом удалялись не прикрепившиеся к культуральному пластику клетки. В последующем смену ростовой среды проводили 1 раз в течение 3 сут. При достижении 80%-й плотности монослоя МСК рассевали. Пересев осуществляли методом трипсинизации, используя 0,25%-й раствор трипсин-EDTA («ПанЭко», Россия). В дальнейшей работе использовали клетки 4–5-го пассажей. Это связано с тем, что МСК 3-го пассажа оцениваются уже как однородные и стабильные популяции, а клетки 8-го пассажа являются стареющими клетками, которые начинают проявлять признаки генетической нестабильности и снижение дифференцировочного потенциала.

Для проведения проточной цитофлуориметрии МСК снимали с культурального пластика методом трипсинизации. Затем промывали натрий-фосфатным буфером Дульбекко – DPBS («ПанЭко», Россия) методом центрифугирования 5 мин 1500 об/мин и фиксировали 4%-м раствором формалина 20 мин при комнатной температуре. После этого отмывали раствором DPBS, ресуспендировали и аликвоты окрашивали с помощью антител (АТ) согласно инструкциям фирм-производителей: мышинные моноклональные АТ против Thy-1, меченные PE/Cy7 (Biolegend, США); мышинные моноклональные АТ против CD29, меченные PE (Biolegend, США); мышинные моноклональные АТ против CD73, меченные Per/Cp 5.5 (Biolegend, США); мышинные моноклональные АТ против CD34, меченные Alexa Fluor 647 (Santa Cruz Biotechnology, США). Анализ клеток на наличие мембранных маркеров стволовых клеток проводили с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSAria™ III (BD Biosciences, США). Результат проточной цитометрии выражен в процентах от общего числа клеток в образце (не менее 100 тыс. клеток на 1 аликвоту).

*Дифференцировка МСК.* Для исследования способности полученных клеточных культур к дифференцировке клетки 4-го пассажа были высеяны на 12-луночные планшеты по 30 тыс. клеток на лунку и инкубировались в ростовой среде до получения монослоя. В дальнейшем для индукции дифференцировки клеточные культуры инкубировали со специальными средами. Дифференцировку осуществляли в трех направлениях: в остеогенном, адипогенном и хондрогенном. Фиксировали результаты дифференциации с помощью инвертированного микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Для остеогенной дифференцировки использовали среду  $\alpha$ -MEM с добавлением 10% FBS, 100 нМ дексаметазона (Sigma, США), 0,5  $\mu$ М 2-фосфата аскорбиновой кислоты (Sigma, США), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия). В качестве контрольной среды использовали среду  $\alpha$ -MEM с добавлением 10% FBS, 0,5  $\mu$ М 2-фосфата аскорбиновой кислоты, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин. С 10-х сут инкубации в среду для остеогенной дифференцировки, так же как и в контрольную среду, добавляли 0,2  $\mu$ М раствора  $\beta$ -глицерофосфата (Sigma, США). Смену сред проводили каждые 3 сут.

Для определения минерализации, являющейся признаком остеогенной дифференцировки, использо-

вали окрашивание по von Kossa. Эта реакция основана на связывании ионов серебра с фосфатными группами. Полученное соединение подвергается фотохимической деградации с выделением ионов серебра, придающим минеральным депозитам серо-коричневый цвет. Для этого перед окрашиванием удаляли питательную среду из лунок планшета. Промывали 0,9%-м раствором NaCl и фиксировали клетки 4%-м раствором формалина 30 мин при комнатной температуре. Затем тщательно промывали лунки достаточным количеством дистиллированной воды 3 раза и заливали 2%-м раствором нитрата серебра в дистиллированной воде. Ставили инкубировать в темноту на 10 мин. Затем промывали дистиллированной водой и инкубировали при ярком свете 1 ч.

Для индукции адипогенной дифференцировки использовали среду DMEM High glucose («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% FBS, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин, 1 мМ дексаметазона, 100 мМ индометацина (Sigma, США), 500 мМ 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX, Sigma, США) и 10 µg/ml инсулина (Sigma, США). С 10-х сут среду заменяли на поддерживающую, отличающуюся отсутствием дексаметазона, индометацина и IBMX. В качестве контрольной среды на всех этапах использовали DMEM High glucose с добавлением 10% FBS, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин. Смену сред проводили каждые 3 сут.

Для выявления дифференцировки в адипогенном направлении использовали качественное окрашивание жировых включений красителем Судан-3 (Sigma, США). Для этого удаляли питательную среду из культуры клеток и фиксировали их 4%-м раствором формалина 30 мин при комнатной температуре. Перед окрашиванием тщательно промывали лунки достаточным количеством дистиллированной воды 3 раза по 5 мин.

При окрашивании клеток Суданом-3 их ядра докрасивали гематоксилином и эозином. Краситель Судан-3 готовили растворением 0,02 г порошка в 10 мл 70%-го этилового спирта. Смесь инкубировали 2 ч при температуре 58 °С. Затем раствор профильтровывали и окрашивали образцы при комнатной температуре 15–30 мин. Затем промывали 0,9%-м раствором NaCl и окрашивали гематоксилином и эозином. Растворы гематоксилина и эозина готовили и проводили окрашивание клеточных культур по стандартной методике.

Для хондрогенной дифференцировки брали  $9 \times 10^5$  клеток 3–6-го пассажей и столько же для контроля. Клетывали от питательной среды и осаждали. МСК для дифференцировки ресуспендировали с 90 мкл дифференцировочной среды для хондрогенной дифференцировки, такое же количество клеток ресуспендировали с 90 мкл контрольной среды. Опытные и контрольные суспензии наносили каплями по 10 мкл на каждую из 3 лунок 24-луночного планшета. Инкубировали МСК при 37 °С 2 ч для адгезии клеток, после чего добавляли по 500 мкл соответствующей среды в каждую лунку. В качестве контрольной среды использовали  $\alpha$ -MEM с добавлением 10% FBS, 0,5 мМ 2-фосфата аскорбиновой кислоты (Sigma, США), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин. В качестве хондрогенной среды использовали среду DMEM-High glucose с добавлением 10% FBS, 0,5 мМ 2-фосфата аскорбиновой кислоты, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина,

2 мМ L-глутамин, 1× ITS (Sigma, США), 100 µM пирувата натрия («ПанЭко», Россия), 1 мМ дексаметазона (Sigma, США), 0,5 мМ 2-фосфата аскорбиновой кислоты (Sigma, США), 10 нг/мл TGF- $\beta$ 1 (Sigma, США). Смену сред проводили каждые 3 сут.

Для выявления хондрогенной дифференцировки проводили окрашивание на присутствие кислых мукополисахаридов, являющихся маркером хондрогенного образования красителем Alcian Blue (Sigma, США). Для этого клеточные культуры фиксировали по 5 мин в 95%-м этиловом спирте, потом в 70%-м этиловом спирте. После чего промывали дистиллированной водой по 30 с 3 раза и окрашивали в течение 1 ч раствором Alcian Blue. Затем промывали под проточной водой 2 мин. Образцы заливали дистиллированной водой и осматривали на инвертированном микроскопе в видимом свете. Раствор красителя Alcian Blue готовили, растворяя 1 г порошка в 100 мл 0,1 М HCl.

*Получение и анализ сперматозоидов животных.* Придатки семенников были получены от здоровых самцов крыс линии Вистар ( $n = 5$ ) после декапитации, у хряков ( $n = 3$ ) – непосредственно после забоя. Придатки семенников были асептически вырезаны и помещены в стерильную чашку Петри. Сперму получали из одного иссеченного придатка семенника, промывая подогретым цитратным буфером («Диаэм», Россия), из другого – DPBS в соотношении 1:2. Если сперма богата сперматозоидами, ее разводили в 10 раз. Все исследования полученных образцов проводили под световым микроскопом на предметных стеклах, подогретых до 37 °С. В дальнейшую экспериментальную работу брали образцы, соответствующие стандартам [21].

Для определения содержания патологических форм сперматозоидов на предметное стекло к капле спермы добавляли краситель 0,05%-й раствор эозина («ПанЭко», Россия) в соотношении 1:2. Смесь спермы с красителем выдерживали 3–5 мин, после чего делали три мазка и просматривали их под микроскопом с иммерсионной системой. Отсчитывали 100–200 клеток, выделяя патологические формы и определяя их процентное содержание. Одновременно подсчитывали количество живых (неокрашенные) и мертвых (окрашенные) сперматозоидов. В норме жизнеспособных клеток в образце должно быть не менее 58%. При оценке подвижности обращали внимание на морфологические дефекты, такие как капли или изогнутые хвосты. Количество клеток спермы с аномальной морфологией не должно превышать 10%.

Для определения подвижности сперму с помощью полуавтоматических дозаторов разводили в 20 раз подогретым раствором цитратного буфера/DPBS. Подсчитывали количество подвижных вперед сперматозоидов среди двухсот подсчитанных сперматозоидов, определяя процент прогрессивной подвижности. Эякуляты с подвижностью менее 70% и высоким содержанием агглютинированных групп клеток выбраковывались. Подсчет проводился как минимум в четырех различных полях. Все результаты представлены в процентах от общего числа сперматозоидов.

Определение целостности акросомы в сперме проводили путем окрашивания образцов красителем Coomassie G250 (Sigma, США). Образцы спермы помещали на предметные стекла, инкубировали в свежеприготовленном растворе красителя (0,22% Coomassie Blue G250, 50% метанола, 10% ледяной уксусной кислоты,



40% воды) в течение 2 мин. Потом стекла тщательно промывали дистиллированной водой для удаления избыточного окрашивания и проводили осмотр под световым микроскопом.

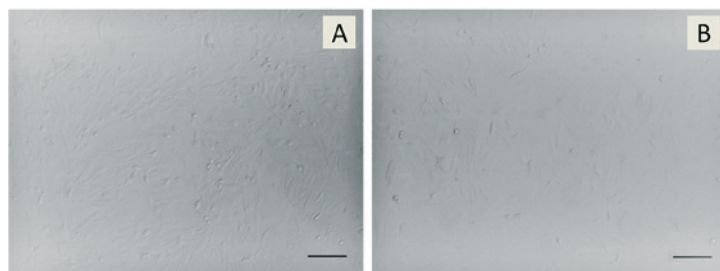


Рис. 1. Первичная культура мезенхимных стволовых клеток: А – свиньи; В – крысы (увеличение 100х)

Fig. 1. Primary MSC culture: A – pigs; B – rats (100x magnification)

Таблица 1

Количество МСК животных ( $n = 3$ ) в выделенной популяции, несущих характерные маркеры мезенхимных стволовых клеток, %

Table 1

Number of animal MSCs ( $n = 3$ ) in the isolated cell population demonstrating typical markers of MSC, %

| Маркер<br>Животное | Thy-1  | CD29   | CD73   | CD34 |
|--------------------|--------|--------|--------|------|
| Крыса              | 95 ± 3 | 97 ± 1 | 95 ± 6 | 0    |
| Свинья             | 98 ± 2 | 94 ± 3 | 92 ± 4 | 0    |

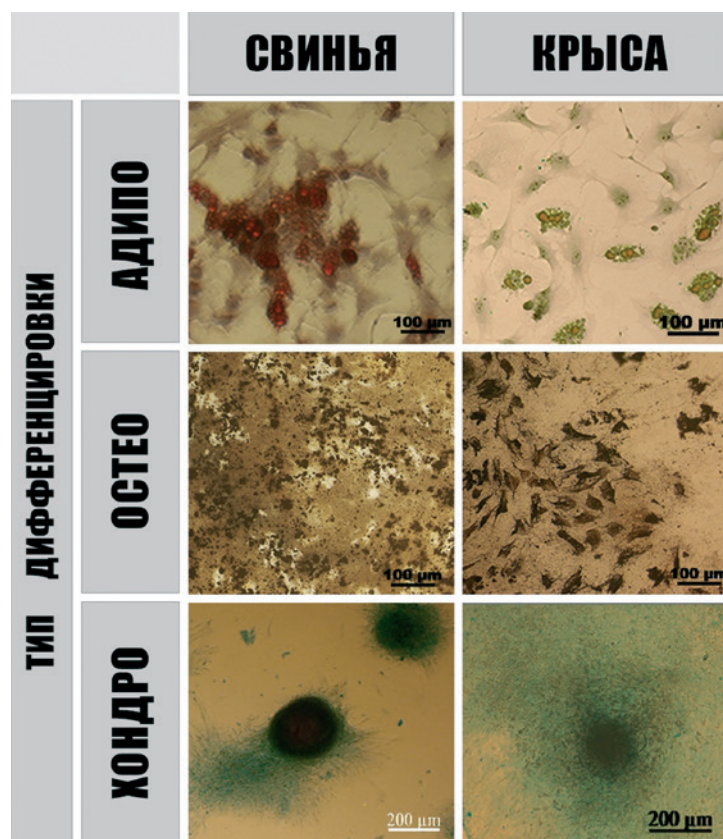


Рис. 2. Результат дифференцировки МСК крысы и свиньи адипогенного происхождения (увеличение указано на фотографиях)

Fig. 2. Differentiation of rat and porcine MSCs of adipogenic origin (magnification is indicated in the pictures)

Соинкубирование МСК и сперматозоидов проводили в соотношении 1 млн МСК крысы/свиньи на 5 млн сперматозоидов крысы/свиньи в объеме 1 мл цитратного буфера/DPBS в  $CO_2$ -инкубаторе при 37 °C в течение 12 ч. Контрольные образцы спермы инкубировали в концентрации 5 млн половых клеток на 1 мл цитратного буфера/DPBS без добавления МСК. Определение количества живых и мертвых сперматозоидов, их подвижности, а также целостности акросом проводили через 3, 5 и 12 ч после начала эксперимента.

**Соблюдение этических стандартов.** На проведение процедур по забору жировой ткани было получено разрешение локального этического комитета Казанского федерального университета (№ 1 от 23.02.2015 на проведение научного исследования по теме «Генная и клеточная терапия в регенеративной ветеринарной медицине»).

**Обработка результатов.** Статистическую обработку полученных данных проводили методами первичного статистического анализа с использованием программы Excel 2016. Результаты представлены как среднее арифметическое по выборке ± стандартное отклонение. Вторичную статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки, изолированные из жировой ткани животных, адгезировались на культуральном пластике и имели фибробластоподобную морфологию (рис. 1).

Выделенные клетки экспрессировали маркеры МСК: Thy-1, CD29, CD73 и не экспрессировали маркер гематопоэтических стволовых клеток CD34 (табл. 1).

Результаты дифференцировки выделенных клеток крысы и свиньи в 3 направлениях отражены на рисунке 2.

Таким образом, принадлежность выделенных и культивируемых клеток свиньи и крысы к пулу МСК подтверждается характерной морфологией при росте *in vitro*, наличием специфических маркеров МСК и отсутствием маркеров других стволовых клеток, а также их дифференцировкой в 3 направлениях.

Из придатков крысы и хряка было получено  $23 \pm 1$  и  $160 \pm 3$  млн сперматозоидов в мл соответственно. Результаты соинкубирования сперматозоидов крысы/хряка с МСК крысы/свиньи отражены на рисунке 3.

Жизнеспособность и прогрессивная подвижность сперматозоидов считаются ключевыми факторами, которые могут влиять на скорость как искусственного, так и естественного оплодотворения. Оценка спермы по этим параметрам по-прежнему является золотым стандартом прогнозирования фертильности *in vitro* и *in vivo* [22]. Согласно полученным данным, сперматозоиды крысы более чувствительны к хранению в цитратном буфере и DPBS по сравнению со сперматозоидами хряка. При этом они практически теряют свою подвижность уже через 3 ч хранения в растворах DPBS и цитратного буфера как с МСК, так и без. Одинаковую жизнеспособность сперматозоиды крысы сохраняют в течение 5 ч независимо от того, в каком растворе они находятся. В то время как сперматозоиды хряка лучше сохраняют свою жизнеспособность и подвижность в растворах с МСК. При этом наименьшая потеря подвижности и наибольшее количество живых

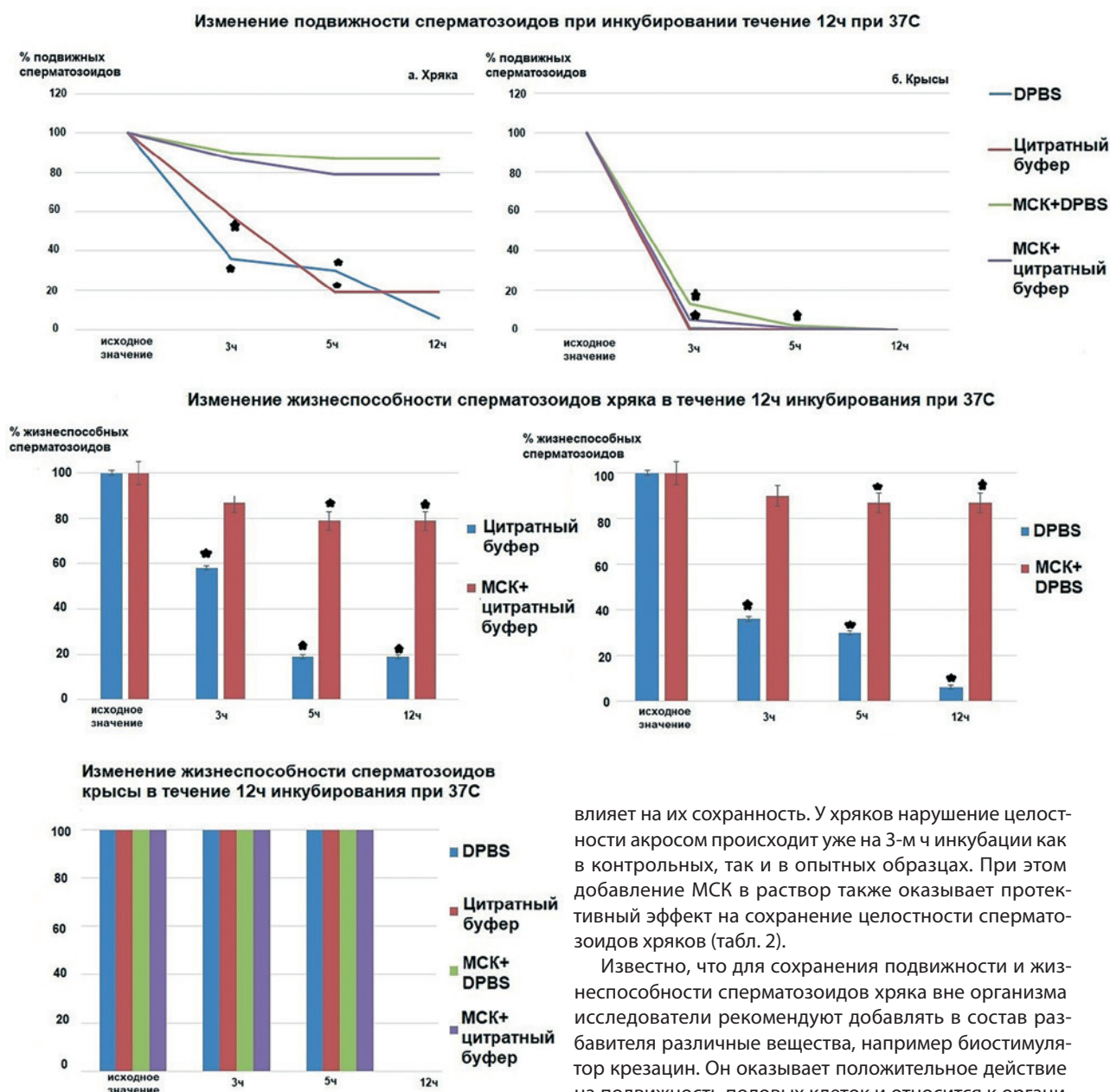


Рис. 3. Изменение жизнеспособности и подвижности сперматозоидов хряка и крысы (\*  $p \leq 0,05$  по сравнению с исходным значением в группе)

Fig. 3. Measuring vitality and motility of the boar and rat sperm cells (\*  $p \leq 0.05$  as compared to initial group value)

сперматозоидов хряка зафиксированы при хранении в DPBS с MCK по сравнению с цитратным буфером с MCK. Но наблюдается значительный положительный эффект от присутствия MCK в среде хранения по сравнению с растворами без MCK: на 12-м ч эксперимента в цитратном буфере было 18% жизнеспособных сперматозоидов хряка, а при добавлении MCK к цитратному буферу жизнеспособность составила 88%. При хранении в DPBS на 12-м ч в образцах было 6% жизнеспособных сперматозоидов, а в присутствии MCK – 88%.

Полученные данные по изменению целостности акросом в течение всего эксперимента указывают на то, что они остаются практически не поврежденными у сперматозоидов крысы до 12-го ч инкубации. Причем внесение MCK в среду инкубирования положительно

влияет на их сохранность. У хряков нарушение целостности акросом происходит уже на 3-м ч инкубации как в контрольных, так и в опытных образцах. При этом добавление MCK в раствор также оказывает протективный эффект на сохранение целостности сперматозоидов хряков (табл. 2).

Известно, что для сохранения подвижности и жизнеспособности сперматозоидов хряка вне организма исследователи рекомендуют добавлять в состав разбавителя различные вещества, например биостимулятор крезацин. Он оказывает положительное действие на подвижность половых клеток и относится к органическим химическим соединениям [23]. Однако добавление MCK, возможно, будет иметь положительный эффект не только на сами сперматозоиды, но и на свиноматок при осеменении, так как, согласно литературным данным, добавление кондиционированной среды от MCK к образцам спермы жеребцов не только не ухудшило параметры спермы в течение 2 ч инкубации, но и смягчало ранние воспалительные реакции эндометрия у кобыл при искусственном оплодотворении этими образцами. Исследователи связывают полученный эффект с MB, выделенными MCK в среду культивирования [24].

Наши исследования показали отсутствие ярко выраженных как положительных, так и отрицательных эффектов MCK на сперму крыс по сравнению со сперматозоидами хряка. Это можно объяснить тем, что, согласно литературным данным [25], имеются различия в содержании органических соединений, в частности белков и их соединений, в клеточной мембране сперматозоидов крысы и хряка (табл. 3), вследствие чего половые клетки этих животных по-разному реагируют на сигналы извне.

**Таблица 2**  
Изменение целостности акросом сперматозоидов крысы и хряка в ходе эксперимента, %

**Table 2**  
Changes in rat and boar acrosome integrity during the experiment, %

|       | Растворитель    |                | Исходное | 3 ч   | 5 ч   | 12 ч  |
|-------|-----------------|----------------|----------|-------|-------|-------|
| Крыса | Цитратный буфер | контроль       | 0        | 0     | 0     | 0,71  |
|       |                 | добавление МСК | 0        | 0     | 0     | 0,33* |
|       | DPBS            | контроль       | 0        | 0     | 0,31  | 2,00  |
|       |                 | добавление МСК | 0        | 0     | 0     | 0,33* |
| Хряк  | Цитратный буфер | контроль       | 0        | 0,33  | 0,67  | 1,20  |
|       |                 | добавление МСК | 0        | 0,33  | 0,71  | 1,10  |
|       | DPBS            | контроль       | 0        | 0,67  | 0,82  | 0,97  |
|       |                 | добавление МСК | 0        | 0,33* | 0,51* | 0,67* |

\*  $p \leq 0,05$  по сравнению с контрольным значением в группе на данную временную точку (as compared to the group control value at the given time point).

**Таблица 3**  
Состав цитоплазматических мембран каудальных сперматозоидов крысы и хряка (по Р. Agrawal, 1988),  $\mu\text{g}$

**Table 3**  
Cytoplasmic membrane composition of rat and boar caudal sperm cells (according to P. Agrawal, 1988),  $\mu\text{g}$

| Названия веществ              |                      | Крыса | Хряк |
|-------------------------------|----------------------|-------|------|
| Белок фосфолипидов            |                      | 0,63  | 1,47 |
| Общий холестерол фосфолипидов |                      | 0,18  | 0,17 |
| Десмостерол                   |                      | 0,32  | 0,32 |
| Фосфолипиды                   | фосфатдилсерин       | 10    | 3    |
|                               | фосфатдилэтанолламин | 31    | 28   |
|                               | сфингомиелин         | 30    | 62   |
|                               | дифосфатдиглицерол   | 1     | –    |
|                               | другие               | 8     | 7    |

Так, например, концентрации общего холестерина фосфолипидов, десмостерола, фосфатдилэтанолламина в цитоплазматической мембране каудальных сперматозоидов крысы и хряка практически одинаковы. Но содержание сфингомиелина и фосфатдилсерина значительно различается. Сфингомиелина в цитоплазматической мембране каудальных сперматозоидов крыс почти в 2 раза меньше, чем в сперматозоидах хряка. Известно, что сфингомиелин оказывает влияние на подвижность сперматозоидов и целостность их мембран. Есть данные о положительной корреляции между содержанием данного фосфолипида в клеточной мембране сперматозоидов человека и их подвижностью [26]. В сперматозоидах крысы содержится меньше сфингомиелина по сравнению со сперматозоидами хряка. Вероятно, поэтому в контроле они теряют подвижность уже к 3-му ч инкубирования. Но даже при этих условиях сперматозоиды крысы сохраняют большую подвижность в присутствии МСК (рис. 2) по сравнению с контрольной группой. Различное содержание белков, отвечающих за двигательную активность сперматозоидов в мембране мужских половых клеток хря-

ка и крысы, и, как следствие, различная функциональность, скорее всего, обусловлены различной длиной половых путей у самок этих животных.

Концентрация фосфолипида фосфатдилсерина также значительно отличается у сперматозоидов хряка и крысы. Он ответственен за активность сперматозоидов. Этот фосфолипид в норме находится на внутренней стороне клеточной мембраны, при переходе на внешнюю сторону в результате различных процессов в клетке является ранним маркером апоптоза [27]. В своей статье Р. Agrawal et al. [25] определили концентрацию фосфатдилсерина в целой мембране сперматозоидов. Поэтому делать какие-то выводы по этим данным относительно проведенной работы нецелесообразно.

Также известно, что сперматозоиды крыс обладают чрезвычайной чувствительностью к условиям центрифугирования, пипетирования и охлаждения из-за длинного хвоста, формы, размера головки и состава мембраны [28]. Отсутствие какого-либо эффекта в эксперименте на сперматозоиды крысы, возможно, объясняется небольшим количеством выделенных МВ из добавленных МСК в среду хранения. В исследованиях А. Mokarizadeh et al. [29] приводятся данные по криоконсервации сперматозоидов крыс с МВ, собранными при культивировании МСК жировой ткани. Исследователи отмечают, что добавление 25 мкг МВ в пересчете на общий белок не оказывает на сперматозоиды какого-либо существенного влияния по сравнению с контролем без добавления МВ. В то же время криоконсервация сперматозоидов крысы с 50 и 100 мкг МВ в пересчете на общий белок достоверно увеличивает количество живых и подвижных сперматозоидов после размораживания. К сожалению, в задачу данной работы не входило выделение и определение влияния производных МСК на состояние сперматозоидов крыс, поэтому мы не можем достоверно подтвердить это предположение.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние несколько десятилетий большая часть исследовательской работы была сосредоточена на методах по улучшению эффективности хранения/криоконсервации спермы, что считается одной из основных проблем в репродуктивной биотехнологии. Применяемые подходы основываются на защите сперматозоидов от вредного воздействия процедур хранения и криоконсервации, включая использование различных экстендеров, криопротекторов, антиоксидантов и питательных компонентов. Более того, некоторые из этих исследований были сосредоточены на восстановлении поврежденных сперматозоидов при их замораживании и оттаивании [30]. Восстановление поврежденных во время хранения сперматозоидов считается крайне важным для улучшения их жизнеспособности и фертильности [31]. Известно, что стволовые клетки выделяют паракринные факторы, усиливающие клеточную защиту и запускающие антиапоптотические и антиоксидантные механизмы [32]. А производные стволовых клеток – МВ – имеют сходные с родительскими клетками эффекты на окружающие их ткани и клетки [33]. Возможно, применение стволовых клеток и их производных МВ может защитить сперму от отрицательных последствий хранения/криоконсервации, таких как окислительный стресс, апоптоз, повреждение ДНК и потеря митохондриальной активности. Анализируя полу-



ченные результаты, нельзя однозначно рекомендовать использовать МСК при хранении сперматозоидов всех животных. Необходимо выяснить особенности взаимодействия между сперматозоидами животных и МСК, механизм такого влияния и особенности искусственного осеменения животных таким семенем. Это позволит заполнить серьезные пробелы в знаниях и технологиях длительного хранения половых клеток. Данное научное направление имеет важное значение для зоотехники и биотехнологии сохранения половых клеток различных видов редких и исчезающих животных. Наряду с научным прогрессом, связанным с открытием маркеров фертильности сперматозоидов, существует острая необходимость в улучшении жизнеспособности и фертильности сперматозоидов после хранения (размораживания) путем усовершенствования способов хранения (криоконсервации) с целью получения высокопродуктивных сельскохозяйственных животных для обеспечения продовольственной безопасности в глобальном масштабе.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Епишина Т. М. Эффективность стимуляции эструса у свиней с помощью физических факторов. *Зоотехния*. 2009; 2: 29–30. EDN: JXDGDUD.
2. Ерохин А., Епишина Т., Федина Н. Влияние бычьего сывороточного альбумина на фертильность охлажденного семени хряков. *Свиноводство*. 2007; 4: 26–27. EDN: IBOJAR.
3. Медведев Г. Ф., Гавриченко Н. И., Бudevich А. И. Разбавитель для среднесрочного хранения спермы хряков. *Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства*. 2011; 14 (2): 314–320. EDN: RUHIEX.
4. Исаев Д. А., Захарова Е. Е., Капралова И. В., Кривохарченко И. С., Картавенко Т. В., Михайловская Г. В. и др. Краткосрочное хранение спермы без замораживания в программах ЭКО/ИКСИ. *Проблемы репродукции*. 2015; 21 (4): 65–70. DOI: 10.17116/repro201521465-70.
5. Meek S., Mashimo T., Burdon T. From engineering to editing the rat genome. *Mamm. Genome*. 2017; 28 (7–8): 302–314. DOI: 10.1007/s00335-017-9705-8.
6. Neff E. P. Rats on the rise. *Lab. Anim (NY)*. 2021; 50 (8): 205–208. DOI: 10.1038/s41684-021-00812-0.
7. Zakirova E. Yu., Valeeva A. N., Aimaletdinov A. M., Nefedovskaya L. V., Akhmetshin R. F., Rutland C. S., Rizvanov A. A. Potential therapeutic application of mesenchymal stem cells in ophthalmology. *Exp. Eye Res.* 2019; 189:107863. DOI: 10.1016/j.exer.2019.107863.
8. Jiménez A. J. V., Guerrero F. F. Células madre mesenquimales como nueva terapia en dermatología: conceptos básicos. *Revista Clínica de Dermatología Veterinaria*. 2017; 9: 8–18. Режим доступа: <https://immunestem.com/wp-content/uploads/2021/02/18-TERAPIA-CELULAR-EN-DERMATOLOGIA.pdf>.
9. Salikhov R. Z., Masgutov R. F., Chekunov M. A., Tazetdinova L. G., Masgutova G., Teplov O. V., et al. The stromal vascular fraction from fat tissue in the treatment of osteochondral knee defect: case report. *Front. Med. (Lausanne)*. 2018; 5:154. DOI: 10.3389/fmed.2018.00154.
10. Wang Y., Yi H., Song Y. The safety of MSC therapy over the past 15 years: a meta-analysis. *Stem Cell Res. Ther.* 2021; 12 (1):545. DOI: 10.1186/s13287-021-02609-x.
11. Zakirova E. Yu., Aimaletdinov A. M., Malanyeva A. G., Rutland C. S., Rizvanov A. A. Extracellular vesicles: new perspectives of regenerative and reproductive veterinary medicine. *Front. Vet. Sci.* 2020; 7:594044. DOI: 10.3389/fvets.2020.594044.
12. Qamar A. Y., Hussain T., Rafique M. K., Bang S., Tanga B. M., Seong G., et al. The role of stem cells and their derived extracellular vesicles in restoring female and male fertility. *Cells*. 2021; 10 (9):2460. DOI: 10.3390/cells10092460.
13. Gade N. E., Nath A., Pratheesh M. D., Dubey P. K., Amarpal, Kumar G. S., Sharma G. T. Stem cell therapy in animal sciences – a review. *Agricultural Reviews*. 2012; 33 (2): 150–158. Article ID: ARCC575.
14. Bogers S. H. Cell-based therapies for joint disease in veterinary medicine: what we have learned and what we need to know. *Front. Vet. Sci.* 2018; 5:70. DOI: 10.3389/fvets.2018.00070.
15. Закирова Е. Ю., Аймалетдинов А. М., Тамбовский М. А., Ризванов А. А. Сравнительная характеристика линий мезенхимных стволовых клеток различных видов животных. *Цитология*. 2021; 63 (2): 139–146. DOI: 10.31857/S0041377121020097.
16. Dias I. E., Pinto P. O., Barros L. C., Viegas C. A., Dias I. R., Carvalho P. P. Mesenchymal stem cells therapy in companion animals: useful for immune-mediated diseases? *BMC Vet. Res.* 2019; 15 (1):358. DOI: 10.1186/s12917-019-2087-2.
17. Naumenko E., Zakirova E., Guryanov I., Akhatova F., Sergeev M., Valeeva A., Fakhrullin R. F. Composite biodegradable polymeric matrix doped with halloysite nanotubes for the repair of bone defects in dogs. *Clays Clay Minerals*. 2021; 69: 522–532. DOI: 10.1007/s42860-021-00152-7.
18. Qamar A. Y., Fang X., Kim M. J., Cho J. Improved viability and fertility of frozen-thawed dog sperm using adipose-derived mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* 2020; 10 (1):7034. DOI: 10.1038/s41598-020-61803-8.
19. Mahiddine F. Y., Kim J. W., Qamar A. Y., Ra J. C., Kim S. H., Jung E. J., Kim M. J. Conditioned medium from canine amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells improved dog sperm post-thaw quality-related parameters. *Animals (Basel)*. 2020; 10 (10):1899. DOI: 10.3390/ani10101899.
20. Александрова Н. М., Аймалетдинов А. М., Маланьева А. Г., Тамбовский М. А., Ризванов А. А., Закирова Е. Ю. Особенности индукции остеодифференцировки мезенхимных стволовых клеток адипогенного происхождения *in vitro*. *Биотехнология*. 2022; 38 (4): 72–79. DOI: 10.56304/S0234275822040032.
21. Комлацкий В. И., Величко Л. Ф., Величко В. А. Биология и этиология свиней: учебное пособие. Краснодар: КубГАУ; 2017. 130 с.
22. Simon L., Lewis S. E. M. Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization *in vitro*. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2011; 57 (3): 133–138. DOI: 10.3109/19396368.2011.553984.
23. Гливанская О. И., Богданович Д. М. Зависимость качества спермы от концентрации биостимулятора в разбавителе в технологии искусственного осеменения свиней. *Таврический научный обозреватель*. 2016; 5–2 (10): 199–202. EDN: WCKXRP.
24. Tongu E. A. O., Segabinazzi L. G. T. M., Alvarenga M. L., Monteiro A., Papa F. O., Alvarenga M. A. Allogenic mesenchymal stem cell-conditioned medium does not affect sperm parameters and mitigates early endometrial inflammatory responses in mares. *Theriogenology*. 2021; 15 (169): 1–8. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2021.03.019.
25. Agrawal P., Magargee S. F., Hammerstedt R. H. Isolation and characterization of the plasma membrane of rat cauda epididymal spermatozoa. *J. Androl.* 1988; 9 (3): 178–189. DOI: 10.1002/j.1939-4640.1988.tb01031.x.
26. Shan S., Xu F., Hirschfeld M., Brenig B. Sperm lipid markers of male fertility in mammals. *Inter. J. Mol. Sci.* 2021; 22 (16):8767. DOI: 10.3390/ijms22168767.
27. Kotwicka M., Jendraszak M., Skibinska I., Jedrzejczak P., Pawelczyk L. Decreased motility of human spermatozoa presenting phosphatidylserine membrane translocation-cells selection with the swim-up technique. *Hum. Cell*. 2013; 26 (1): 28–34. DOI: 10.1007/s13577-011-0024-1.
28. Varisli O., Agca C., Agca Y. Short-term storage of rat sperm in the presence of various extenders. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2013; 52 (6): 732–737. PMID: 24351761.
29. Mokarizadeh A., Rezvanfar M. A., Dorostkar K., Abdollahi M. Mesenchymal stem cell derived microvesicles: trophic shuttles for enhancement of sperm quality parameters. *Reprod. Toxic.* 2013; 42: 78–84. DOI: 10.1016/j.reprotox.2013.07.024.
30. Saadeldin I. M., Khalil W. A., Alharbi M. G., Lee S. H. The current trends in using nanoparticles, liposomes, and exosomes for semen cryopreservation. *Animals (Basel)*. 2020; 10 (12):2281. DOI: 10.3390/ani10122281.
31. Qamar A. Y., Fang X., Kim M. J., Cho J. Improved post-thaw quality of canine semen after treatment with exosomes from conditioned medium of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Animals*. 2019; 9 (11):865. DOI: 10.3390/ani9110865.
32. Ferro F., Spelat R., Shaw G., Duffy N., Islam M. N., O'Shea P. M., et al. Survival/adaptation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after long-term starvation through selective processes. *Stem Cells*. 2019; 37 (6): 813–827. DOI: 10.1002/stem.2998.
33. Bahr M. M., Amer M. S., Abo-El-Sooud K., Abdallah A. N., El-Tookhy O. S. Preservation techniques of stem cells extracellular vesicles: a gate for manufacturing of clinical grade therapeutic extracellular vesicles and long-term clinical trials. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 2020; 8 (1): 1–8. DOI: 10.1080/23144599.2019.1704992.

## REFERENCES

1. Epishina T. M. Efficiency of estrus stimulation at pigs by physical factors. *Zootekhnika*. 2009; 2: 29–30. EDN: JXDGDUD. (in Russ.)
2. Erokhin A., Epishina T., Fedina N. Vliyanie bych'ego syvorotochnogo al'bmina na fertil'nost' ohlazhdennogo semeni hrjakov = Effect of bovine serum albumin on the fertility of chilled boar sperm. *Pigbreeding*. 2007; 4: 26–27. EDN: IBOJAR. (in Russ.)
3. Medvedev G. F., Gavrichenko N. I., Budevich A. I. Dilutings for average-time keeping of the semen boars. *Aktual'nye problemy intensivno-go razvitiya zhivotnovodstva*. 2011; 14 (2): 314–320. EDN: RUHIEX. (in Russ.)
4. Isaev D. A., Zakharova E. E., Kapralova I. V., Krivokharchenko I. S., Kartavenko T. V., Mikhaylovskaya G. V., et al. Short-term liquid sperm storage in



- IVF/ICSI cycles. *Russian Journal of Human Reproduction*. 2015; 21 (4): 65–70. DOI: 10.17116/repro201521465-70. (in Russ.)
5. Meek S., Mashimo T., Burdon T. From engineering to editing the rat genome. *Mamm. Genome*. 2017; 28 (7–8): 302–314. DOI: 10.1007/s00335-017-9705-8.
6. Neff E. P. Rats on the rise. *Lab. Anim (NY)*. 2021; 50 (8): 205–208. DOI: 10.1038/s41684-021-00812-0.
7. Zakirova E. Yu., Valeeva A. N., Aimaletdinov A. M., Nefedovskaya L. V., Akhmetshin R. F., Rutland C. S., Rizvanov A. A. Potential therapeutic application of mesenchymal stem cells in ophthalmology. *Exp. Eye Res*. 2019; 189:107863. DOI: 10.1016/j.exer.2019.107863.
8. Jiménez A. J. V., Guerrero F. F. Células madre mesenquimales como nueva terapia en dermatología: conceptos básicos. *Revista Clínica de Dermatología Veterinaria*. 2017; 9: 8–18. Available at: <https://immunestem.com/wp-content/uploads/2021/02/18-TERAPIA-CELULAR-EN-DERMATOLOGIA.pdf>. (in Spanish)
9. Salikhov R. Z., Masgutov R. F., Chekunov M. A., Tazetdinova L. G., Masgutova G., Teplov O. V., et al. The stromal vascular fraction from fat tissue in the treatment of osteochondral knee defect: case report. *Front. Med. (Lausanne)*. 2018; 5:154. DOI: 10.3389/fmed.2018.00154.
10. Wang Y., Yi H., Song Y. The safety of MSC therapy over the past 15 years: a meta-analysis. *Stem Cell Res. Ther*. 2021; 12 (1):545. DOI: 10.1186/s13287-021-02609-x.
11. Zakirova E. Yu., Aimaletdinov A. M., Malanyeva A. G., Rutland C. S., Rizvanov A. A. Extracellular vesicles: new perspectives of regenerative and reproductive veterinary medicine. *Front. Vet. Sci*. 2020; 7:594044. DOI: 10.3389/fvets.2020.594044.
12. Qamar A. Y., Hussain T., Rafique M. K., Bang S., Tanga B. M., Seong G., et al. The role of stem cells and their derived extracellular vesicles in restoring female and male fertility. *Cells*. 2021; 10 (9):2460. DOI: 10.3390/cells10092460.
13. Gade N. E., Nath A., Pratheesh M. D., Dubey P. K., Amarpal, Kumar G. S., Sharma G. T. Stem cell therapy in animal sciences – a review. *Agricultural Reviews*. 2012; 33 (2): 150–158. Article ID: ARCC575.
14. Bogers S. H. Cell-based therapies for joint disease in veterinary medicine: what we have learned and what we need to know. *Front. Vet. Sci*. 2018; 5:70. DOI: 10.3389/fvets.2018.00070.
15. Zakirova E. Yu., Aimaletdinov A. M., Tambovsky M. A., Rizvanov A. A. Comparative characteristics of mesenchymal stem cell lines from different animal species. *Tsitologia*. 2021; 63 (2): 139–146. DOI: 10.31857/S0041377121020097. (in Russ.)
16. Dias I. E., Pinto P. O., Barros L. C., Viegas C. A., Dias I. R., Carvalho P. P. Mesenchymal stem cells therapy in companion animals: useful for immune-mediated diseases? *BMC Vet. Res*. 2019; 15 (1):358. DOI: 10.1186/s12917-019-2087-2.
17. Naumenko E., Zakirova E., Guryanov I., Akhatova F., Sergeev M., Valeeva A., Fakhrullin R. F. Composite biodegradable polymeric matrix doped with halloysite nanotubes for the repair of bone defects in dogs. *Clays Clay Minerals*. 2021; 69: 522–532. DOI: 10.1007/s42860-021-00152-7.
18. Qamar A. Y., Fang X., Kim M. J., Cho J. Improved viability and fertility of frozen-thawed dog sperm using adipose-derived mesenchymal stem cells. *Sci. Rep*. 2020; 10 (1):7034. DOI: 10.1038/s41598-020-61803-8.
19. Mahiddine F. Y., Kim J. W., Qamar A. Y., Ra J. C., Kim S. H., Jung E. J., Kim M. J. Conditioned medium from canine amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells improved dog sperm post-thaw quality-related parameters. *Animals (Basel)*. 2020; 10 (10):1899. DOI: 10.3390/ani10101899.
20. Aleksandrova N. M., Aimaletdinov A. M., Malanyeva A. G., Tambovskii M. A., Rizvanov A. A., Zakirova E. Yu. Features of induction of osteodifferentiation *in vitro* adipose-derived mesenchymal stem cells. *Biotechnologia*. 2022; 38 (4): 72–79. DOI: 10.56304/S0234275822040032. (in Russ.)
21. Komlatsky V. I., Velichko L. F., Velichko V. A. Biology and ethology of swine: study guide. Krasnodar: FSBEI HE Kuban SAU; 2017. 130 p. (in Russ.)
22. Simon L., Lewis S. E. M. Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization *in vitro*. *Syst. Biol. Reprod. Med*. 2011; 57 (3): 133–138. DOI: 10.3109/19396368.2011.553984.
23. Glivanskaya O. I., Bogdanovich D. M. Dependence of semen quality on concentration of biostimulant in diluent for technology of artificial insemination of pigs. *Tauride Scientific Observer*. 2016; 5–2 (10): 199–202. EDN: WCKXRP. (in Russ.)
24. Tongu E. A. O., Segabinazzi L. G. T. M., Alvarenga M. L., Monteiro A., Papa F. O., Alvarenga M. A. Allogenic mesenchymal stem cell-conditioned medium does not affect sperm parameters and mitigates early endometrial inflammatory responses in mares. *Theriogenology*. 2021; 15 (169): 1–8. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2021.03.019.
25. Agrawal P., Magargee S. F., Hammerstedt R. H. Isolation and characterization of the plasma membrane of rat cauda epididymal spermatozoa. *J. Androl*. 1988; 9 (3): 178–189. DOI: 10.1002/j.1939-4640.1988.tb01031.x.
26. Shan S., Xu F., Hirschfeld M., Brenig B. Sperm lipid markers of male fertility in mammals. *Inter. J. Mol. Sci*. 2021; 22 (16):8767. DOI: 10.3390/ijms22168767.
27. Kotwicka M., Jendraszak M., Skibinska I., Jedrzejczak P., Pawelczyk L. Decreased motility of human spermatozoa presenting phosphatidylserine membrane translocation-cells selection with the swim-up technique. *Hum. Cell*. 2013; 26 (1): 28–34. DOI: 10.1007/s13577-011-0024-1.
28. Varisli O., Agca C., Agca Y. Short-term storage of rat sperm in the presence of various extenders. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci*. 2013; 52 (6): 732–737. PMID: 24351761.
29. Mokarizadeh A., Rezvanfar M. A., Dorostkar K., Abdollahi M. Mesenchymal stem cell derived microvesicles: trophic shuttles for enhancement of sperm quality parameters. *Reprod. Toxic*. 2013; 42: 78–84. DOI: 10.1016/j.reprotox.2013.07.024.
30. Saadeldin I. M., Khalil W. A., Alharbi M. G., Lee S. H. The current trends in using nanoparticles, liposomes, and exosomes for semen cryopreservation. *Animals (Basel)*. 2020; 10 (12):2281. DOI: 10.3390/ani10122281.
31. Qamar A. Y., Fang X., Kim M. J., Cho J. Improved post-thaw quality of canine semen after treatment with exosomes from conditioned medium of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Animals*. 2019; 9 (11):865. DOI: 10.3390/ani9110865.
32. Ferro F., Spelat R., Shaw G., Duffy N., Islam M. N., O'Shea P. M., et al. Survival/adaptation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after long-term starvation through selective processes. *Stem Cells*. 2019; 37 (6): 813–827. DOI: 10.1002/stem.2998.
33. Bahr M. M., Amer M. S., Abo-El-Sooud K., Abdallah A. N., El-Tookhy O. S. Preservation techniques of stem cells extracellular vesicles: a gate for manufacturing of clinical grade therapeutic extracellular vesicles and long-term clinical trials. *Int. J. Vet. Sci. Med*. 2020; 8 (1): 1–8. DOI: 10.1080/23144599.2019.1704992.

Поступила в редакцию / Received 22.10.2023

Поступила после рецензирования / Revised 20.11.2023

Принята к публикации / Accepted 29.11.2023

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Закирова Елена Юрьевна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий научно-исследовательской лабораторией «Регенеративная ветеринария» ИФМиБ КФУ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-6750-640X>, e-mail: [lenahamzina@yandex.ru](mailto:lenahamzina@yandex.ru).

**Маланьева Альбина Геннадьевна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Регенеративная ветеринария» ИФМиБ КФУ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-4408-5363>, e-mail: [aleksalbina@bk.ru](mailto:aleksalbina@bk.ru).

**Аймалетдинов Александр Маазович**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Регенеративная ветеринария» ИФМиБ КФУ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-1403-8635>, e-mail: [allekss1982@mail.ru](mailto:allekss1982@mail.ru).

**Elena Yu. Zakirova**, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Head of Research Laboratory for Veterinary Regenerative Medicine, IFMB KFU, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-6750-640X>, e-mail: [lenahamzina@yandex.ru](mailto:lenahamzina@yandex.ru).

**Albina G. Malanyeva**, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Research Laboratory for Veterinary Regenerative Medicine, IFMB KFU, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-4408-5363>, e-mail: [aleksalbina@bk.ru](mailto:aleksalbina@bk.ru).

**Aleksandr M. Aimaletdinov**, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Research Laboratory for Veterinary Regenerative Medicine, IFMB KFU, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-1403-8635>, e-mail: [allekss1982@mail.ru](mailto:allekss1982@mail.ru).