

**МОДИФИЦИРОВАННАЯ СРЕДА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ СПЕРМИЕВ  
БАРАНА К ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОМУ ОПЛОДОТВОРЕНИЮ  
ПОВЫШАЕТ ИХ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ****В.А. БЕЛЯЕВ<sup>1</sup>, Н.А. ГВОЗДЕЦКИЙ<sup>1</sup>, А.А. КАНИБОЛОЦКАЯ<sup>1</sup>,  
М.П. СЕМЕНЕНКО<sup>2</sup>, Е.В. КУЗЬМИНОВА<sup>2</sup>**

Длительное сохранение на уровне клетки воспроизводительных качеств животного необходимо для современной селекции, в том числе с применением экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). За последние годы достигнуты значительные успехи в разработке методов подготовки спермы животных для оплодотворения яйцеклетки *in vitro*. Основная цель таких методик — получить популяцию подвижных спермиев с подходящей морфологией и способностью к оплодотворению ооцита *in vivo* или *in vitro*. Однако эти приемы не всегда эффективны в силу особенностей подготовки клеток и отсутствия стандартов проведения процедуры. Нами предложена модифицированная среда для экстракорпорального оплодотворения, адаптированная для культивирования спермиев барана. Сперму баранов северокавказской породы (возраст — 2-3 года) получали согласно принятым стандартам и инструкциям. Отобранные образцы оценивали органолептически и при микроскопировании, дальнейшую подготовку проводили по методике-прототипу, описанной в статье А.Р. Gandhi (2000), и по разработанной нами методике, согласно которой сперма вносится в глюкозо-цитратно-желточный разбавитель (ГЦЖ), после чего переносится в среду SOF wash, приготовленную без глюкозы и глутамина с добавлением бычьего сывороточного альбумина (6 мг/мл), кофеина (0,2 мг/мл) и гепарина (50 мкг/мл). Установлено, что предложенная нами модифицированная методика, используемая для дозревания спермиев, позволяет повысить их активность на 1,3 балла по сравнению с существующей технологией, при этом число живых спермиев увеличивается на 43,7 %, их жизнеспособность возрастает в 1,6 раза, а доля спермиев с прямолинейно-поступательным движением — в 1,6 раза. Таким образом, разработанная нами методика культивирования сперматозоидов барана, предназначенных для ЭКО, значительно улучшает качественные и количественные характеристики образцов, что позволяет рекомендовать ее применение в лабораториях вспомогательных репродуктивных технологий при подготовке спермы животных к оплодотворению *in vitro*.

**Ключевые слова:** сперма, капацитация, экстракорпоральное оплодотворение, бараны, питательные среды.

Перспективы повышения и поддержания продуктивности связаны с непрерывным генетическим совершенствованием животных и созданием условий для фенотипического проявления наследственного потенциала (1). Совершенствованием биотехнологических приемов воспроизводства в России занимались на протяжении многих лет (1–4). В ряде отечественных публикаций содержатся сведения о трансплантации (5), способах получения эмбрионов и использовании оттаянной спермы (6), подготовке сперматозоидов быков к оплодотворению яйцеклеток *in vitro* и увеличению их оплодотворяющей способности (7), о морфологической оценке и повышении капацитации спермы хряков (8, 9). Опыт зарубежных ученых основывается на признании целесообразности экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) свежеполученной спермой (6, 10, 11).

Однако и для повышения качества ЭКО именно сохранение качества спермы остается критическим фактором. Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) включают разнообразные процедуры отделения от семенной плазмы наиболее жизнеспособных гамет для оплодотворения яйцеклетки. Основная цель этих методик — получение популяции подвижных спермиев с подходящей морфологией и способностью к оплодотворению ооцита в условиях *in vivo* или *in vitro*. При применении так называемой капацитации (дозревание, инкубация) в результате биохимических модификаций на уровне мембраны клетки (аналогичный процесс

происходит в истмусе) движение спермиев меняется с регулярного волнообразного на хлыстоподобное (12). При этом в области акросомы с плазмалеммы сперматозоида удаляются гликопротеины и протеины семенной плазмы, что способствует акросомальной реакции (11, 13) и позволяет освободиться от погибших сперматозоидов, посторонних клеток и их фрагментов. Капацитация *in vitro* проходит в специальных средах — Кребса-Рингера и Тироде, Бринстера с высокой ионной силой, BW, TC-199 с фетальной сывороткой (10 %) или сывороткой крупного рогатого скота (14). Клетки разделяют различными способами: однократно или дважды отмывая спермии в культуральной среде с дальнейшим центрифугированием; флотационными методами (в том числе *swim up*), основанными на принципе самостоятельной миграции либо осаждения спермиев; центрифугированием в градиенте плотности перколлы, позволяющим разделять разные типы спермиев и выбирать подходящие по морфофункциональным свойствам, и др. (5, 15). Наименее распространена обработка спермы фильтрацией, но стоит отметить, что она применима только для образцов хорошего качества, к тому же из-за сложности процедуры использовать фильтрацию спермы в ветеринарных целях нецелесообразно (15, 16).

Несмотря на широкий арсенал технологий, вопрос о том, какой из методов наиболее подходит для обработки и подготовки спермы в условиях *in vitro*, на сегодняшний день остается открытым.

Новизна выполненного нами исследования заключатся в разработке усовершенствованного метода подготовки спермы баранов для экстракорпорального оплодотворения. Предложенная процедура заметно улучшает качественные и количественные характеристики сперматозоидов и может быть рекомендована для практического использования.

Целью настоящей работы было изучение жизнеспособности спермиев баранов при их культивировании в модифицированной среде для экстракорпорального оплодотворения.

*Методика.* В эксперименте использовали сперму баранов северокавказской породы в возрасте 2-3 лет ( $n = 6$ ), отвечающих требованиям класса элита. Масса животных колебалась от 107,5 до 110,6 кг. Бараны-производители соответствовали требованиям по продуктивности согласно практическому руководству («Порядок и условия проведения бонитировки племенных овец тонкорунных пород, полутонкорунных пород мясного направления продуктивности». М., 2011). Сперму получали уретральным методом от каждого барана 2 раза в неделю с интервалом 2 сут в условиях вивария, используя искусственную вагину фирмы «Minitüb GmbH» (Германия) согласно описаниям (2, 17).

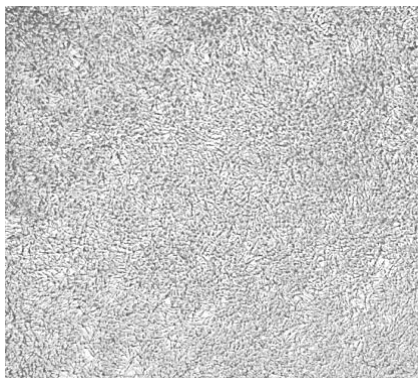
Полученные образцы оценивали органолептически и при микроскопировании (Микмед-2, «ЛОМО», Россия; увеличение  $\times 100$ ) (18). Световую микроскопию на разных этапах исследования проводили в соответствии с руководством ВОЗ и ГОСТ 32277-2013 (15, 17). Резистентность спермиев оценивали стандартным методом (по В.К. Милованову и А.И. Короткову) по изменению активности в присутствии NaCl. Образцы окаршивали 10 % раствором нигрозина (ООО ТПО «Ленпромхим», Россия) и 10 % раствором эозина (ООО «Кемикал Лайн», Россия) (17).

Согласно методике-прототипу, описанной нами ранее (19), свежеполученную сперму барана выдерживали в среде SOF wash (Synthetic Oviduct Fluide) без глюкозы с HEPES — 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислотой (pH 6,8-8,2), лактатом натрия, пируватом натрия (0,127 мг/мл) и бычьим сывороточным альбумином (3 мг/мл) (ООО «Ориджио», Россия). Для повышения активности и жизнеспособно-

сти спермиев при их подготовке к оплодотворению мы использовали авторскую методику (далее — разработанная методика), согласно которой сперму помещали в глюкозо-цитратно-желточный разбавитель (ГЦЖ), приготовленный по ГОСТ 14746-69: глюкоза медицинская безводная — 30,0 г, натрий лимоннокислый  $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5,5\text{H}_2\text{O}$  — 14,0 г, желток куриного яйца — 200,0 мл, спермосан-3 — 750-900 тыс. ед. (ЧПУП «Гомельский завод ветеринарных препаратов», Беларусь), вода дистиллированная — 1000,0 мл. Затем сперму переносили в среду SOF wash без глюкозы и глутамина с добавлением бычьего сывороточного альбумина (6 мг/мл), кофеина (0,2 мг/мл) и гепарина (50 мкг/мл).

Процедуру swim up проводили в культуральных средах SOF wash и ГЦЖ, используя центрифугирование при 200 g в течение 8 мин («Sigma», США), после чего образцы на 1 ч помещали в атмосферу  $\text{CO}_2$  при 37 °C ( $\text{CO}_2$ -инкубатор, «BINDER GmbH», Германия).

Статистическую обработку данных выполняли в программе Primer of Biostatistic 3.01 («McGraw-Hill, Inc.», США), применяя *t*-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . В таблице приведены средние (*M*) и стандартные ошибки среднего (*m*).



**Мазок спермы барана северокавказской породы после процедуры swim up при подготовке образца по усовершенствованной технологии.** Описание процедуры см. в разделе «Методика». Окраска эозином и нигрозином, увеличение  $\times 100$ , микроскоп Микмед-2 («ЛОМО», Россия).

*Результаты.* Для определения эффективности подготовки спермы по методике-прототипу и с помощью модифицированной процедуры мы сравнили наиболее важные показатели спермиев (активность, резистентность и число живых спермиев с прямолинейно-поступательным движением). Оценку проводили до и после процедуры swim up, в результате которой происходила капацитация спермиев (рис., табл. 1, 2).

Мы установили, что при внесении спермы в среду SOF wash, приготовленную по методике-прототипу, активность спермиев до процедуры swim up снизилась в среднем на 70,9 % по отношению к нормальным значениям, после процедуры swim up — возросла на 14,5 %. Таким образом, после созревания спермиев

в среде SOF wash показатели активности достоверно ( $p < 0,05$ ) снижались на 47,6 %.

Анализ доли спермиев с прямолинейно-поступательным движением при внесении свежеполученной спермы только в среду SOF wash до процедуры swim up показал уменьшение значений на 47,9 %, после — их некоторое (на 11,4 %) увеличение, тем не менее, они оставались меньше нормативов, утвержденных по ГОСТ. Доля живых спермиев после swim up сократилась на 53,2 %. Поскольку число половых клеток в сперме должно быть не менее 80 %, низкие значения (46,8 %) свидетельствовали о непригодности образца для оплодотворения яйцеклеток.

Резистентность спермиев по нормативу должна составлять от 20 до 40 тыс. ед. В нашем исследовании после внесения спермиев в разбавитель SOF wash она снизилась на 54,06 %, но после swim up увеличилась на 21,00 %, составив до капацитации от  $18,48 \pm 0,20$  до  $14,23 \pm 0,40$  тыс. ед., после капацитации — от  $18,10 \pm 0,30$  до  $23,10 \pm 0,30$  тыс. ед., однако это не соответствовало нормативным показателям.

Таким образом, установлено, что использование среды SOF wash снижает показатели жизнеспособности спермы, что не позволяет рекомендовать ее для подготовки образцов к оплодотворению in vitro.

### 1. Некоторые показатели качества спермиев при разных методах обработки (бараны северокавказской породы, $n = 10$ , $M \pm m$ )

№ животного	SOF wash			ГЦЖ + SOF wash		
	активность, балл	живых спермиев, %	резистентность, тыс. ед.	активность, балл	живых спермиев, %	резистентность, тыс. ед.
До процедуры swim up						
1	5,5±0,5*	49,8*	18,45±0,20*	8,9±0,3*	95,2*	36,40±0,20*
2	5,2±0,6*	50,7*	16,30±0,47*	8,9±0,3*	94,8*	33,24±0,30*
3	5,4±0,5*	51,2*	15,26±0,30*	8,9±0,3*	94,9*	32,60±0,46*
4	5,8±0,4*	49,0*	14,87±0,30*	8,9±0,3*	93,6*	31,59±0,30*
5	5,7±0,5*	48,2*	14,23±0,40*	8,8±0,4*	93,7*	34,74±0,20*
6	5,4±0,5*	49,9*	15,60±0,11*	8,9±0,3*	93,5*	32,10±0,12*
Всего	5,5±0,5*, **	49,8*, **	15,80±0,30*, **	8,9±0,3*, **	94,3*, **	33,40±0,30*, **
После процедуры swim up						
1	6,6±0,5*	47,3*	23,10±0,30*	8,6±0,5*	91,3*	31,60±0,20*
2	6,2±0,4*	48,2*	20,30±0,20*	8,7±0,4*	91,0*	33,20±0,20*
3	6,7±0,5*	46,6*	19,60±0,40*	8,9±0,3*	90,4*	29,30±0,30*
4	6,0±0,5*	46,0*	18,90±0,30*	8,7±0,5*	89,9*	27,90±0,30*
5	6,3±0,5*	45,6*	18,10±0,30*	8,6±0,5*	90,0*	31,10±0,10*
6	6,0±0,7*	47,0*	19,60±0,40*	8,7±0,5*	90,1*	28,20±0,20*
Всего	6,3±0,5*, **	46,8*, **	19,90±0,30*, **	8,7±0,5*, **	90,5*, **	32,20±0,20*, **

Примечание. SOF wash — Synthetic Oviduct Fluide, ГЦЖ — глюкозо-цитратно-желточный разбавитель, swim up — процедура отмывки (подробнее см. в разделе «Методика»).

\* Различия показателей до и после процедуры swim up статистически значимы при  $p < 0,05$ .

\*\* Различия показателей до и после процедуры swim up, проведенной по двум методикам, статистически значимы при  $p < 0,05$ .

### 2. Доля (%) спермиев с прямолинейно-поступательным движением при разных методах обработки (бараны северокавказской породы, $n = 10$ )

№ животного	SOF wash	ГЦЖ + SOF wash
До процедуры swim up		
1	52,4	94,7
2	50,5	94,0
3	51,8	94,2
4	52,9	94,1
5	53,0	93,7
6	51,6	94,2
Всего	52,03	94,2
После процедуры swim up		
1	59,4*	92,6*
2	59,0*	92,9*
3	60,0*	93,4*
4	57,9*	92,7*
5	58,4*	92,5*
6	57,8*	92,4*
Всего	58,8*	92,7*

Примечание. SOF wash — Synthetic Oviduct Fluide, ГЦЖ — глюкозо-цитратно-желточный разбавитель, swim up — процедура отмывки (подробнее см. в разделе «Методика»).

\* Различия показателей до и после процедуры swim up статистически значимы при  $p < 0,05$ .

Сравнив активность спермиев, обнаружили, что разница между нормой и показателем после внесения в ГЦЖ до процедуры swim up составляла 5,6 % в сторону уменьшения, после swim up — достоверно ( $p < 0,05$ ) сократилась еще на 2,1 %. В целом обработка спермы по предложенной нами методике снижала активность на 7,7 %.

Абсолютное число спермиев с прямолинейно-поступательным движением при применении ГЦЖ уменьшалось по отношению к первоначальным значениям на 6,2 % до применения swim up и на 7,9 % — после этой процедуры. Число живых спермиев в пробе после внесения аликвоты в среду ГЦЖ до процедуры swim up достоверно уменьшилось на 5,7 %, после завершения капацитации — еще на 9,5 %. Эти показатели находятся в пределах нормативных значений для числа жи-

вых спермиев в образце по ГОСТ.

Резистентность спермиев при использовании модифицированной методики капацитации осталась в пределах нормы (до swim up — снизилась на 2,7 %, после — на 9,1 %).

Кроме того, мы подробно охарактеризовали жизнеспособность спермиев при внесении в SOF wash + ГЦЖ в норме, до и после процедуры swim up. Сравнение средних значений активности спермиев по груп-

пам дает основание утверждать, что достоверное различие между свежеполученной спермой и той, которую готовили по методике-прототипу, ниже на 1,4 балла, при этом разница между значениями для спермиев, подготовленных по обоим методикам, после их созревания составляла 1,3 балла. Доля спермиев с прямолинейно-поступательным движением в образцах, подготовленных по разработанной методике, до swim up была в 1,8 раза, а после swim up — в 1,6 раз выше, чем в пробах, обработанных согласно методике-прототипу. В среде SOF wash + ГЦЖ до swim up число живых половых клеток было на 47,2 % (то есть практически в 2 раза) больше, чем в SOF wash. После процедуры флотации в среде SOF wash + ГЦЖ число живых клеток увеличилось на 43,7 %. До процедуры swim up резистентность спермиев в варианте с методикой-прототипом была в 2,1 раза меньше, чем при использовании разработанной методики. После проведения swim up спермии в среде SOF wash + ГЦЖ были в 1,6 раза более жизнеспособными, чем в среде SOF wash без ГЦЖ.

В репродуктивной биологии разработка процедур созревания и оплодотворения половых клеток в пробирке составляет важное направление фундаментальных и прикладных исследований (20-22). Следует признать, что подготовке свежеполученной спермы не уделялось достаточного внимания, хотя это важный фактор успешного оплодотворения и получения здорового потомства (23). Публикации, в которых представлены результаты исследования морфологии спермиев при подготовке эякулята баранов к ЭКО, практически отсутствуют (24). В настоящее время ученые Ставропольского государственного аграрного университета — единственная в России научная группа, которая занимается изучением процессов оплодотворения овец *in vitro*, включая успешное получение эмбрионов животных *in vitro* и использование заморожено-оттаянной спермы. Разработанная методика подготовки спермиев баранов к ЭКО значительно улучшает их качественные и количественные характеристики, что позволяет рекомендовать ее для лабораторий вспомогательных репродуктивных технологий при подготовке спермы животных к оплодотворению *in vitro*.

Итак, мы показали, что в предложенной модификации способ подготовки спермиев повышает их активность на 1,3 балла по сравнению с существующей технологией, при этом число живых спермиев увеличивается на 43,7 %, их жизнеспособность возрастает в 1,6 раза, число спермиев с прямолинейно-поступательным движением — в 1,6 раза, что связано со специфическим влиянием на спермии глюкозы, лимоннокислого натрия и яичного желтка. Повышение качественных и количественных характеристик образцов, которое достигается при применении предложенного метода, позволяет повышать эффективность экстракорпорального оплодотворения и получения здорового потомства.

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Ставропольский государственный аграрный университет,

355017 Россия, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12,  
e-mail: valstavvet@yandex.ru, dorohin.2012@inbox.ru;

<sup>2</sup>ФГБНУ Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт,

350004 Россия, г. Краснодар, ул. 1-я Линия, 1,  
e-mail: sever291@mail.ru

Поступила в редакцию  
30 декабря 2016 года

# IN MODIFIED MEDIUM FOR *in vitro* FERTILIZATION

V.A. Belyaev<sup>1</sup>, N.A. Gvozdetkii<sup>1</sup>, A.A. Kanibolotskaya<sup>1</sup>, M.P. Semenenko<sup>2</sup>,  
E.V. Kuz'minova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Stavropol State Agrarian University, 12, per. Zootekhnicheskii, Stavropol, 355017 Russia, e-mail dorohin.2012@inbox.ru (corresponding author);

<sup>2</sup>Krasnodar Research Veterinary Institute, Federal Agency of Scientific Organizations, 1, ul. 1-ya Liniya, Krasnodar, 350004 Russia, e-mail sever291@mail.ru (corresponding author)

ORCID:

Belyaev V.A. orcid.org/0000-0001-7454-8472

Semenenko M.P. orcid.org/0000-0001-8266-5900

Gvozdetkii N.A. orcid.org/0000-0002-6856-4932

Kuz'minova E.V. orcid.org/0000-0003-4744-0823

Kanibolotskaya A.A. orcid.org/0000-0003-3003-4175

The authors declare no conflict of interests

Received December 30, 2016

doi: 10.15389/agrobiol.2017.2.291eng

## Abstract

Modern livestock necessitates controlled breeding, one of the main methods of which is a long-term preservation of animal reproductive qualities at cell level. In recent years, a considerable progress has been achieved in the development of techniques of animal sperm preparation for *in vitro* fertilization (IVF). In these, the main purpose is to obtain population of motile sperm with a suitable morphology capable of *in vivo* or *in vitro* oocyte fertilization. However, these methods are not always effective because of the lack of standards for the procedure. We first in Russia carried out a study on the viability of ram sperm cultured in the modified IVF medium. The semen was sampled from North Caucasian rams, 2-3 years of age, according to a routine technique, used for sheep and goats' artificial insemination, and domestic State Standards GOST 32222-2013. Sperm was evaluated on organoleptic and microscopic parameters, and cultured for capacitation to render the spermatozoa competent to fertilize an oocyte according to the prototype procedure, described by A.P. Gandhi (2000), and the method, developed by us. In the modified procedure, the sperm is brought to glucose-yolk-citrate diluent (GYC) and then transferred to medium SOF wash, prepared without glucose and supplemented with glutamine with 6 mg/ml bovine serum albumin, 0.2 mg/ml caffeine and 50 mg/ml heparin. The developed technique increased the activity of sperm by 1.3 points compared to the commonly used method, the number of live semen increased by 43.7 %, their vitality increased 1.6 times and the number of spermatozoa with rectilinear movements was 1.6 times higher. Thus, the developed technique significantly improves ram sperm qualitative and quantitative characteristics and allows us to recommend this method of animal sperm maturation for *in vitro* fertilization procedure.

Keywords: sperm, capacitation, *in vitro* fertilization, rams, nutrient media.

## REFERENCES

1. Magomedov Z.Z. *Doklady Rossiiskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk*, 2008, 3: 42-44 (in Russ.).
2. Hansen P.J. Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. In: *Current and future reproductive technologies and world food production*. G.C. Lamb, N. DiLorenzo (eds.). Springer New York, 2014, V. 752: 1-22 (doi: 10.1007/978-1-4614-8887-3\_1).
3. Romar R., Funahashi H., Coy P. *In vitro* fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years. *Theriogenology*, 2016, 85(1): 125-134 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.017).
4. Krivoruchko A.Y., Belyaev V.A., Kondrat I.Yu., Osipova Yu.S., Metlyayeva A.V. *Vestnik veterinarii*, 2013, 2(65): 50-53 (in Russ.).
5. Trukhachev V.I., Nikitin V.YA., Mikhailyuk V.M., Belugin N.V., Pisarenko N.A., Skripkin V.S. *Rossiiskii veterinarnyi zhurnal*, 2007, spetsial'nyi vypusk: 35-36 (in Russ.).
6. Trukhachev V.I., Krivoruchko A.Yu., Belyaev V.A., Kvochko A.N., Shakhova V.N. *Sposob polucheniya embrionov ovets in vitro*. Pat. 2525714 RF, MPK: A01K67/02, A61D19/04 [Sheep embryo production *in vitro*. Patent 2525714 RF, MPK: A01K67/02, A61D19/04]. *Byul. № 23*, 2014: 19 (in Russ.).
7. Golubets L.V. *Ekstrakorporal'noe oplodotvorenije ootsitov krupnogo rogatogo skota: metodicheskie rekomendatsii* [Extracorporeal fertilization of cattle oocytes guidelines]. Grodno, 2010 (in Russ.).
8. Medvedev G.F. *Vestnik Belorusskoi gosudarstvennoi sel'skokhozyaistvennoi akademii*, 2007, 3: 76-80 (in Russ.).
9. Ganzha A.I., Letkevich L.L., Kostikova I.V. *Zootekhnicheskaya nauka Belarusi (Zhodino)*, 2008, 43(1): 8-15 (in Russ.).
10. Martin G.B. An Australasian perspective on the role of reproductive technologies in world food

- production. In: *Current and future reproductive technologies and world food production*. G.C. Lamb, N. DiLorenzo (eds.). Springer New York, 2014, V. 752: 181-197 (doi: 10.1007/978-1-4614-8887-3\_1).
11. Nallella K.P., Sharma R.K., Aziz N., Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil. Steril.*, 2006, 85: 629-634 (doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.08.024).
  12. Guzick D.S., Overstreet J.W., Factor-Litvak P., Brazil C.K., Nakajima S.T., Coutifaris C. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N. Engl. J. Med.*, 2001, 345: 1388-1393 (doi: 10.1056/NEJMoa003005).
  13. Aitken R.J., Baker M.A. The role of proteomics in understanding sperm cell biology. *Int. J. Androl.*, 2008, 31: 295-302 (doi: 10.1111/j.1365-2605.2007.00851.x).
  14. Studentsov A.P. *Akusherstvo, ginekologiya i biotekhnika reproduksii zhivotnykh* /Pod redaktsiei V.Ya. Nikitina [Obstetrics, gynecology and biotechnology of animal reproduction. V.Ya. Nikitin (ed.)]. Moscow, 2011 (in Russ.).
  15. Vsemirnaya organizatsiya zdравookhraneniya, Mediko-geneticheskii nauchnyi tsentr RAMN. *Rukovodstvo VOZ po issledovaniyu i obrabotke eyakulyata cheloveka* /Pod redaktsiei L.F. Kurilo [WHO guidelines for human semen analysis and processing. L.F. Kurilo (ed.)]. Zheneva, 2012 (in Russ.).
  16. Guimarrès A.C., Leivas F.G., Santos F.W., Schwengber E.B., Giotto A.B., Machado C.I., Gonzalves C.G., Folchini N.P., Brum D.S. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases in vitro fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Anim. Reprod.*, 2014, 146: 103-110 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.02.016).
  17. GOST 32222-2013. *Sredstva vosproizvodstva. Sperma. Metody otbora prob* [State Standard GOST 32222-2013. Reproduction. Semen. Methods for sampling]. Moscow, 2014 (in Russ.).
  18. Leboeuf B., Delgadillo J.A., Manfredi E., Piacère A., Clément V., Martin P., Pellicer M., Boué P., De Cremoux R. Management of goat reproduction and insemination for genetic improvement in France. *Reprod. Domest. Anim.*, 2008, 43: 379-385 (doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01188.x).
  19. Belyaev V.A., Krivoruchko A.Y., Shakhova V.N., Gvozdetskii N.A., Kanibolotskaya A.A. Development methods to reduce agglutination of sperm cells in the preparation of freshly sperm to the process for production embryos in vitro. *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.*, 2016, 7(5): 893-897.
  20. Volpes A., Sammartano F., Rizzari S., Gullo S., Marino A., Allegra A. The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. *Assist. Reprod. Genet.*, 2016, 33(6): 765-770 (doi: 10.1007/s10815-016-0696-2).
  21. Wei X., Xiaoling Z., Kai M., Rui W., Jing X., Min G., Zhonghong W., Jianhui T., Xinyu Z., Lei A. Characterization and comparative analyses of transcriptomes for in vivo and in vitro produced peri-implantation conceptuses and endometria from sheep. *J. Reprod. Dev.*, 2016, 62(3): 279-287 (doi: 10.1262/jrd.2015-064).
  22. Paramio M.T., Izquierdo D. Current status of in vitro embryo production in sheep and goats. *Reprod. Domest. Anim.*, 2014, 49: 37-48 (doi: 10.1111/rda.12334).
  23. Lypéz-Saucedo J., Santiago-Moreno J., Fierro R., Izquierdo D., Coloma M.A., Catalá M.G., Jiménez I., Paramio M.T. Fertilization capacity of cryopreserved Iberian ibex epididymal sperm in a heterologous in vitro fertilization assay. *Zygote*, 2015, 23(1): 136-144 (doi: 10.1017/S0967199413000518).
  24. Anzalone D.A., Iuso D., Czernik M., Ptak G., Loi P. Plasma membrane and acrosome loss before ICSI is required for sheep embryonic development. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2016, 33(6): 757-763 (doi: 10.1007/s10815-016-0709-1).