

Т. И. Кузьмина¹, Х. Торнер¹, Х. Альм²

Функциональная активность митохондрий в нативных и девитрифицированных ооцитах *Bos Taurus* при созревании in vitro

Аннотация. Трудности в разработке эффективной технологии витрификации женских гамет обусловлены особенностями строения ооцита, чувствительностью клеточных компартментов к воздействию сверхнизких температур, токсичностью криопротекторов. Цель настоящего исследования — оценить влияние предварительной обработки (перед витрификацией) ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) *Bos Taurus* жидкостью фолликулов (ЖФ) $d \leq 3$ мм на митохондриальную активность (МА) в размороженных ооцитах. МА оценивали в: нативных ооцитах; нативных ооцитах, обработанных ЖФ; девитрифицированных ооцитах; девитрифицированных ооцитах, обработанных ЖФ (120 мин, 38,5°C). ОКК витрифицировали в соответствии с методом, описанным нами ранее [Кузьмина Т. И др., Ген. и разв. жив., 2014, № 4, С. 15–19]. Девитрифицированные ооциты культивировали в среде ТС-199 с 20% фетальной бычьей сыворотки, 50 нг/мл бычьего пролактина (Sigma) совместно с 1×10^6 кл/мл гранулезы в течение 24 ч при температуре 38,5°C в атмосфере 5% CO₂ и 90%-ной влажности. Митохондрии визуализировали Mito Tracker Orange CMTMRos (MTOCMTMRos, Sigma). Показатели МА, выражавшиеся в уровнях интенсивности флуоресценции MTOCMTMRos (ИФМТОCMTMRos, мКА) фиксировали на стадиях диплотены, метафаз -I и II. Уровень МА до культивирования был значительно выше в нативных ооцитах, чем в девитрифицированных ооцитах ($337 \pm 17,4$ мКА и $319 \pm 16,8$ мКА против $87 \pm 9,2$ мКА и $171 \pm 14,5$ мКА, $P < 0,01$). Предварительная обработка ооцитов ЖФ повышала уровень МА в девитрифицированных ооцитах на стадиях метафазы I и II ($131 \pm 10,9$ мКА против $201 \pm 8,7$ мКА и $109 \pm 9,9$ мКА против $151 \pm 12,8$ мКА, $P < 0,01$). Не обнаружено различий в уровне МА в ооцитах на стадии метафазы I и II нативных и девитрифицированных ооцитов, предварительно обработанных ЖФ. Полученные результаты дополняют имеющиеся сведения о функционировании клеточных компартментов (митохондрий) в женских гаметах животных при воздействии сверхнизких температур.

Ключевые слова: ооцит, созревание in vitro, митохондрии, витрификация, *Bos Taurus*.

Авторы:

Кузьмина Татьяна Ивановна — доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник; e-mail: prof.kouzmina@mail.ru;

Торнер Хельмут — доктор биологических наук, научный сотрудник; e-mail: h-torner@t-online.de;

Альм Ханна — кандидат биологических наук, научный сотрудник; e-mail: ca.alm@t-online.de.

¹ «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; 196601, Россия, г. Санкт-Петербург, п. Тярлево, Московское шоссе, 55 а;

² Лейбницкий Институт биологии сельскохозяйственных животных, Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Думмерсторф, Германия.

Введение. Всевозрастающий запрос наукоемких клеточных репродуктивных биотехнологий в наличии необходимого количества донорских ооцитов коров для получения нативных и реконструированных эмбрионов (клонированных и трансгенных) вызывает необходимость разработки эф-

фективных методов криоконсервации женских гамет. Несмотря на значительные усилия криобиологов и эмбриотехнологов проблема криорезистентности ооцитов *Bos Taurus* далека от успешного разрешения [1]. Трудности в разработке эффективной технологии криоконсервации женских

гамет обусловлены целым рядом причин, связанных с особенностями строения ооцита, чувствительностью различных клеточных компартментов к воздействию сверхнизких температур, токсичностью криопротекторов [2]. Витрификация — дешевый и быстрый метод криоконсервации при котором используются высокие концентрации криопротекторов и ультрабыстрый режим замораживания, способствующий предотвращению кристаллизации внутриклеточной воды, что снижает возможность криоповреждений интрацитоплазматических структур [3]. Идентификация особенностей функционирования органелл декриоконсервированных ооцитов при экстракорпоральном созревании позволит подойти к решению проблемы криорезистентности женской гаметы в целом.

Цель настоящего исследования — оценить эффект предварительной обработки (до витрификации) ооцитов коров жидкостью из фолликулов $d \leq 3$ мм на функциональную активность митохондрий в нативных и девитрифицированных женских гаметах при экстракорпоральном созревании в динамике культивирования.

Условия, материалы и методы исследований. Объектом исследования служили ооцит-кумулюсные комплексы коров голштинской породы половозрелого возраста. Яичники, полученные на мясокомбинате, доставляли в лабораторию в стерильном физиологическом растворе при температуре 32–35°C. Для исследований отбирали яичники без видимых признаков патологии, промывали в теплом физиологическом растворе (38,5°C) с антибиотиками (50 мкг/мл стрептомицина и 100 ед./мл пенициллина). Ооцит-кумулюсные комплексы выделяли аспирацией содержимого фолликулов диаметром 3–6 мм и помещали в чашки Петри средой ТС-199 с 5% фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Для экспериментов отбирали ооциты округлой формы, с гомогенной ооплазмой, равномерной по ширине зоной пеллюцида, окруженные многослойным компактным кумулюсом (не менее 5–6 слоев). Ооцит-кумулюсные комплексы одной из экспериментальных и контрольной групп, предназначенных для витрификации, инкубировали в гомологичной инактивированной жидкости фолликулов (≤ 3 мм) в течение 120 минут при температуре 38,5°C в атмосфере 5% CO₂, 90% влажности, затем обрабатывали тремя растворами криопротекторов (КПА), приготовленными на среде ТС-199, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки. Состав КПА-1: 0,7 М диметилсульфоксида (ДМСО) и 0,9 М этиленгликоля (ЭГ); КПА-2: 1,4 М ДМСО и 1,8 М ЭГ; КПА-3: 2,8 М ДМСО, 3,6 М ЭГ и 0,65 М трегалозы. Ооциты поэтапно помещали на 30 сек в КПА-1,

потом в КПА-2 и, наконец, в КПА-3 на 20 сек. Соломины с ооцитами опускали в жидкий азот. Витрифицированные ооциты находились в жидком азоте не менее 1 ч. Для девитрификации ооциты извлекали из соломин и помещали в 3 мл 0,25 М трегалозы в среде ТС-199, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки, отмывали последовательно в растворе трегалозы сначала в 0,19 М, затем в 0,125 М при 38,5°C и завершали отмывку средой ТС-199 с 20% фетальной бычьей сывороткой. Ооцит-кумулюсные комплексы культивировали группами по 15–20 штук в каплях (объемом 200 мкл) среды ТС-199, содержащей 20% фетальной бычьей сыворотки, 50 нг/мл бычьего пролактина (Эндокринологический центр РАН, Москва), 0,55 мг/мл лактата кальция, 0,23 мг/мл пирувата натрия, 1,27 мг/мл Нерес и 50 мкг/мл гентамицина. Культивирование ооцит-кумулюсных комплексов проводили совместно с клетками гранулезы (1 млн клеток на 1 мл среды) в течение 24 ч при температуре 38,5°C в атмосфере 5% CO₂ и 90%-ной влажности в соответствии с методикой, описанной нами ранее [4]. Митохондрии визуализировали флуоресцентным зондом Mito Tracker Orange CMTMRos, для чего ооцит-кумулюсные комплексы по 15–20 штук помещали в капли 500 нМ раствора Mito Tracker Orange CMTMRos объемом 500 мкл и инкубировали в темноте при температуре 38,5°C в течение 30 минут. [5] Затем отмывали от красителя в теплом (38,5°C) фосфатном буферном растворе, содержащем 3% фетальной бычьей сыворотки. Отмытые ооциты очищали от кумулюсных клеток путем инкубации в 0,1%-ном растворе трипсина при 38,5°C в течение 5–10 минут. Ооциты переносили в раствор Хенкса, содержащий 3,7% параформальдегида, и фиксировали в течение 15 минут при 38,5°C, затем переносили на стекло Superfrost. Рядом с ооцитами помещали капли раствора Хехста 33258 (2,5 мкг/мл) и накрывали покровным стеклом. Препараты хранили в холодильнике при 0–4°C. Все использованные в исследовании реагенты, за исключением обозначенных — производства фирмы Sigma-Aldrich. Образцы анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5, длины волн возбуждения и эмиссии соответственно 540 нм, 570 нм. Интенсивность измеряли с помощью фотометра (Nikon Photometry system P 100 — Nikon).

Для сравнения результатов, полученных в опытных и контрольных группах, использовали критерий t-критерий Стьюдента, данные обработаны с помощью статистической программы Sigma Stat. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$ для 3–5 независимых экспериментов.

Анализ и обсуждение результатов. Представленные нами ранее исследования выявили, что предварительная инкубация ооцитов коров и свиней в инактивированной гомологичной жидкости фолликулов малого диаметра (≤ 3 мм) оказывала позитивный эффект на показатели ядерно-цитоплазматического созревания девитрифицированных ооцитов и дальнейшее развитие развившихся из них эмбрионов [6]. Эффект объясняли ингибирующим действием жидкости из фолликулов малого диаметра ($d \leq 30$ мм), содержащей низкомолекулярную фракцию белков, на реинициацию мейоза, что позволяет избегать повреждений тонкой структуры хроматина, и высокой вязкостью фолликулярной жидкости, препятствующей образованию кристаллов. Положительное влияние проявлялось в увеличении доли созревших ооцитов и значительном росте количества эмбрионов на стадии поздней морулы и бластоцисты [7]. Завершение мейотического созревания ооцита — комплексный процесс преобразования хроматина и функционирования интрацитоплазматических органелл [8, 9]. Митохондрии — клеточные компартменты, реакция которых на воздействия различных химических и физических агентов опережает реакции других органелл [10, 11]. В наших исследованиях проведен мониторинг функциональной активности митохондрий в нативных ооцитах и в ооцитах, подвергшихся воздействию сверхнизких температур. Показатели активности митохондрий, выражавшиеся в уровнях интенсивности флуоресценции специфического зонда Mito Tracker Orange CMTMRos (мкА), фиксировали в динамике мейоза до культивирования (стадия диплотены), через 14 часов культивирования (стадия метафазы-I) и по завершении мейотического созревания (стадия метафазы-II). Данные показате-

телей интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos представлены в таблице. После оттаивания интенсивность флуоресценции Mito Tracker Orange CMTMRos в девитрифицированных ооцитах были значительно ниже, чем в нативных (рис. 1а и 1б). В девитрифицированных ооцитах, подвергшихся обработке фолликулярной жидкостью, интенсивность флуоресценции превышала таковую в девитрифицированных ооцитах, не обработанных жидкостью фолликулов (171 ± 14 мкА против $87 \pm 9,2$ мкА, $P < 0,05$). В нативных ооцитах митохондриальная активность снижалась по мере культивирования и на стадии метафазы-II составила: в необработанных фолликулярной жидкостью ооцитах $148 \pm 12,1$ мкА, а в ооцитах, обработанных жидкостью фолликулов — $147 \pm 11,7$ мкА.

В нативных ооцитах митохондриальная активность снижалась по мере культивирования и на стадии метафазы-II составила: в необработанных фолликулярной жидкостью ооцитах $148 \pm 12,1$ мкА, а в ооцитах, обработанных жидкостью фолликулов — $147 \pm 11,7$ мкА.

Не обнаружено достоверных различий в уровне интенсивности флуоресценции нативных ооцитов и девитрифицированных ооцитов, подвергшихся воздействию жидкости фолликулов ($151 \pm 12,8$ мкА). В девитрифицированных ооцитах наблюдали рост показателя функциональной активности митохондрий (интенсивность флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos) со стадии диплотены до метафазы I, однако при достижении гаметами стадии метафазы II отмечено снижение интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos до $109 \pm 9,9$ мкА. Этот показатель оказался минимальным при анализе функциональной активности в ооцитах всех исследованных групп экспери-

Таблица 1. Интенсивность флуоресценции Mito Tracker Orange CMTMRos в нативных и девитрифицированных ооцитах коров при созревании in vitro (число ооцитов — 394, 3–5 повторности)

Группы эксперимента	Инкубация в ЖФ* (Ø фолликулов ≤ 3 мм)	n ооцитов	Интенсивность флуоресценции Mito Tracker Orange CMTMRos (мкА) в ооцитах на стадиях:		
			диплотена	Метафаза -I	Метафаза -II
Нативные ооциты	-	101	$337 \pm 17,4^a$	$198 \pm 12,3^e$	$148 \pm 12,1^m$
	+	99	$319 \pm 16,8^b$	$213 \pm 13,8^f$	$147 \pm 11,7^n$
Девитрифицированные ооциты	-	98	$87 \pm 9,2^c$	$131 \pm 10,9^j$	$109 \pm 9,9^o$
	+	96	$171 \pm 14,5^d$	$201 \pm 8,7^k$	$151 \pm 12,8^p$

ЖФ* — жидкость фолликулов

Достоверность различия сравниваемых значений (t-критерий Стьюдента): a;c;b;c; a;m;b;d $P < 0,001$, a;d;a:e; b:f; c;d;b;n;f;j $P < 0,01$, e;j;j:k; e;m;f;n; e;j; k;p;c;o;d:k $P < 0,05$

мента. Завершение ядерного созревания сопровождалось снижением митохондриальной активности, что, вероятно свидетельствует о завершении процессов, вовлеченных в цитоплазматическое созревание ооцита перед блоком, предшествующим активации яйцеклетки сперматозоидом. Низкий уровень флуоресценции в девитрифицированных ооцитах на стадии метафазы II по сравнению с нативными, возможно также, связан с повреждающим действием сверхнизких температур, эффект частично нивелируется обработкой гамет инактивированной гомологичной жидкостью фолликулов малого диаметра.

Выводы. Выявлены особенности функционирования митохондрии в донорских ооцитах коров, подвергшихся процедуре витрификации. Показана целесообразность предварительной обработки ооцитов гомологичной инактивированной жидкостью фолликулов диаметром ≤ 3 мм, что обеспечивало достижение показателей функциональной активности митохондрий (интенсивность

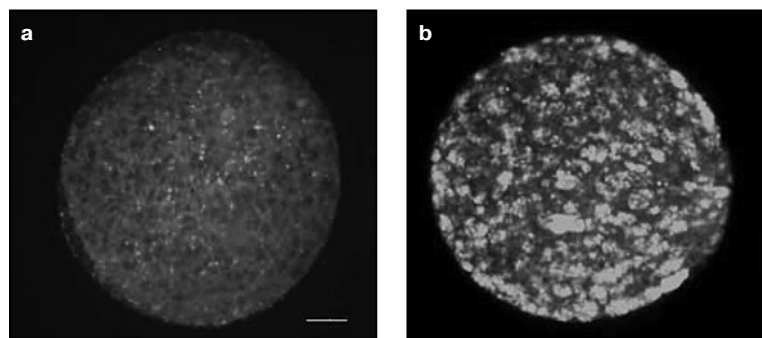


Рис. 1. Репрезентативное изображение митохондрий в ооцитах коров с низким (a) и высоким (b) уровнем интенсивности флуоресценции Mito Tracker Orange MTMRos (конфокальная микроскопия, Leica TCS SP5). Шкала 20 мкм

флуоресценции Mito Tracker Orange CMTMRos) на стадии метафазы II в девитрифицированных ооцитах до уровня интенсивности флуоресценции Mito Tracker Orange CMTMRos в нативных ооцитах. Полученные результаты дополняют имеющиеся сведения о функционировании клеточных компартментов (митохондрий) в женских гаметах животных при воздействии сверхнизких температур.

Работа выполнена в соответствии с темой Государственного задания ФАНО России, номер госрегистрации — АААА-А18-118021590132-9

Литература

1. Paul A. K. Vitriification of bovine matured oocytes and blastocysts in a paper container / A. K. Paul, Y. Liang, K. Srirattana, T. Nagai, R. Parnpai // Anim. Sci. J. — 2018. — V. 89. — 2. — P. 307–315.
2. Katkov I. I. Influence of exposure to vitrification solutions on 2-cell mouse embryos: II. Osmotic effects or chemical toxicity? / I. I. Katkov, A. G. Pogorelov // CryoLetters. — 2007. — V. 28. — P. 409–427.
3. Khalili M. A. Vitriification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review / M. A. Khalili, A. Shahedi, S. Ashourzadeh, S. A. Nottola, G. Macchiarelli, M. G. Palmerini // J. Assist. Reprod. Genet. — 2017. — V. 34. — P. 1413–1426.
4. Кузьмина Т. И. Модернизация этапов технологии экстракорпорального созревания донорских ооцитов Bos Taurus / Т. И. Кузьмина, А. В. Молчанов, Т. И. Станиславович, Д. Н. Татарская // Аграрный научный журнал. — 2017. — № 3. — С. 9–14.
5. Кузьмина Т. И. Методы оценки функционального состояния донорских ооцитов, соматических клеток фолликулов и эмбрионов сельскохозяйственных животных / Т. И. Кузьмина, В. Ю. Денисенко, И. Ю. Лебедева, О. В. Шокин // Метод. рекомендации. Москва. — 2005. — 32 стр.
6. Kuzmina T. I. Effect of pre-treating bovine oocytes with the follicular fluid prior to vitrification on their nuclear-cytoplasmic maturation / T. I. Kuzmina, V. Yu. Denisenko, A. Yu. Malishev // Reproductive BioMedicine. 2010. V. 20. suppl. 3. P. 538–539.
7. Кузьмина Т. И. Развитие доимплантационных эмбрионов Bos Taurus и Sus scrofa domesticus, полученных из девитрифицированных ооцитов / Т. И. Кузьмина, И. П. Шейко, А. И. Ганджа, К. П. Брюсов // Генетика и разведение животных. Санкт-Петербург-Пушкин. — 2014. — № 4. — С. 15–19.
8. Reader K. L. The Role of Oocyte Organelles in Determining Developmental Competence / K. L. Reader, J.-A. L. Stanton, J. L. Juengel // Biology. — 2017. — V. 6. — P. 35.
9. Babayev E. Oocyte mitochondrial function and reproduction / E. Babayev, E. Seli // Curr Opin Obstet Gynecol. — 2015. — V. 27. — P. 175–181.

10. Roth Z. Reduction in oocyte developmental competence by stress is associated with alterations in mitochondrial function / Z. Roth // J. Dairy Sci. — 2018. — V. 101, 1–13.
11. Rybska M. Cytoplasmic and nuclear maturation of oocytes in mammals — living in the shadow of cells developmental capability / M. Rybska, S. Knap, M. Jankowski, M. Jeseta, D. Bukowska, P. Antosik, M. Nowicki, M. Zabel, B. Kempisty, J. M. Jaśkowski // Medical Journal of Cell Biology. — 2018. — V. 6. — P. 13–17.

Kuzmina T.¹, Torner H.¹, Alm H.²

Functional activity of mitochondria in native and devitrified *Bos Taurus* oocytes during in vitro maturation

Abstract. Difficulties in developing an effective technology for vitrification of female gametes are connection with the features of the structure of oocytes, the sensitivity of cellular compartments to the action of ultralow temperatures, the toxicity of cryoprotectants. The aim of this study is to evaluate the effect of pre-treatment (before vitrification) of *Bos Taurus* oocytes with fluid of follicles (FF) $d \leq 3$ mm on mitochondrial activity (MA) in thawed oocytes. MA was evaluated in: native oocytes; native oocytes treated with FF; devitrified oocytes; devitrified oocytes treated with FF (120 min, 37°C). The oocyte-cumulus complexes were vitrified in accordance with the method described by us earlier (Kuzmina T. Et al., Gen. & Breed. of Anim., 2014, № 4, p. 15–19). The devitrified oocytes were cultured in TC-199 medium with 20% fetal bovine serum, 50 ng / ml bovine prolactin (Sigma) together with 1×10^6 cells / ml of granulosa for 24 hours at 38.5°C in 5% CO₂ and 90% of humidity. Mitochondria were visualized with Mito Tracker Orange CMTMRos (MTOCMTMRos, Sigma). Indicators of MA were expressed in the levels fluorescence intensity of MTOCMTMRos (IFMTOCMTMRos, μA) and were estimated in the stages of diplotene, metaphase -I and II. Before cultivation the level of MA was significantly higher in native oocytes than in devitrified oocytes ($337 \pm 17.4 \mu A$ and $319 \pm 16.8 \mu A$ vs. $87 \pm 9.2 \mu A$ and $171 \pm 14.5 \mu A$, $P < 0.01$). The level of MA have increased in metaphase I and II stages in devitrified oocytes at pre-treated oocytes with FF ($131 \pm 10.9 \mu A$ vs. $201 \pm 8.7 \mu A$ and $109 \pm 9.9 \mu A$ vs. $151 \pm 12.8 \mu A$, $P < 0.01$). There were no differences in the level of MA in metaphase I and II stages native oocytes and oocytes that have pre-treatment by FF. The obtained results supplement data concerning to the functioning of cellular compartments (mitochondria) in female animals gametes at the influence of ultralow temperatures.

Key words: oocyte, in vitro maturation, mitochondria, vitrification, *Bos Taurus*.

Authors:

T. Kuzmina — Doctor Habil. (Biol. Sci.), professor, head of the laboratory of developmental biology; e-mail: prof.kouzmina@mail.ru;

H. Torner — Doctor Habil. (Biol. Sci.), senior researcher; e-mail: h-torner@t-online.de;

H. Alm — PhD (Biol. Sci.), researcher; e-mail: ca.alm@t-online.de.

¹ Russian research institute of farm animal genetics and breeding — branch of the L. K. Ernst Federal science center for animal husbandry, St. Petersburg, p. Tjarlevo, Moskovskoe shosse, 55a; 196601;

² Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany.

Supported by Federal Agency of Scientific Organizations, № AAAA-A18-118021590132-9

References

1. Paul A. K. Vitrification of bovine matured oocytes and blastocysts in a paper container / A. K. Paul, Y. Liang, K. Srirattana, T. Nagai, R. Parnpai // *Anim. Sci. J.* — 2018. — V.89. — 2. — P. 307–315.
2. Katkov I. I. Influence of exposure to vitrification solutions on 2-cell mouse embryos: II. Osmotic effects or chemical toxicity? / I. I. Katkov, A. G. Pogorelov // *CryoLetters.* — 2007. — V. 28. — P. 409–427.
3. Khalili M. A. Vitrification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review / M. A. Khalili, A. Shahedi, S. Ashourzadeh, S. A. Nottola, G. Macchiarelli, M. G. Palmerini // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 2017. — V.34. — P.1413–1426.
4. Kuz'mina T. I. Modernizaciya etapov tekhnologii ehkstrakorporal'nogo sozrevaniya donorskih oocitov Bos Taurus / T. I. Kuz'mina, A. V. Molchanov, T. I. Stanislavovich, D. N. Tatarskaya // *Agrarnyj nauchnyj zhurnal.* — 2017. — № 3. — P. 9–14.
5. Kuz'mina T. I. Metody ocenki funkcional'nogo sostoyaniya donorskih oocitov, somaticheskikh kletok follikulov i ehmbriionov sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh / T. I. Kuz'mina, V. YU. Denisenko, I. YU. Lebedeva, O. V. SHokin // *Metod. rekomendacii.* Moskva. — 2005. — 32 p.
6. Kuzmina T. I. Effect of pre-treating bovine oocytes with the follicular fluid prior to vitrification on their nuclear-cytoplasmic maturation / T. I. Kuzmina, V. Yu. Denisenko, A. Yu. Malishev // *Reproductive BioMedicine.* 2010. V. 20. suppl. 3. P. 538–539.
7. Kuz'mina T. I. Razvitie doimplantacionnyh ehmbriionov Bos Taurus i Sus scrofa domesticus, poluchennyh iz devitrificirovannyh oocitov / T. I. Kuz'mina, I. P. SHEjko, A. I. Gandzha, K. P. Bryusov // *Genetika i razvedenie zhivotnyh.* Sankt-Peterburg-Pushkin. — 2014. — № 4. — P. 15–19.
8. Reader K. L. The Role of Oocyte Organelles in Determining Developmental Competence / K. L. Reader, J.-A. L. Stanton, J. L. Juengel // *Biology.* — 2017. — V. 6. — P. 35.
9. Babayev E. Oocyte mitochondrial function and reproduction / E. Babayev, E. Seli // *CurrOpinObstet Gynecol.* — 2015. — V. 27. — P. 175–181.
10. Roth Z. Reduction in oocyte developmental competence by stress is associated with alterations in mitochondrial function / Z. Roth // *J. Dairy Sci.* — 2018. — V. 101, 1–13.
11. Rybska M. Cytoplasmic and nuclear maturation of oocytes in mammals — living in the shadow of cells developmental capability / M. Rybska, S. Knap, M. Jankowski, M. Jeseta, D. Bukowska, P. Antosik, M. Nowicki, M. Zabel, B. Kempisty, J. M. Jaśkowski // *Medical Journal of Cell Biology.* — 2018. — V. 6. — P. 13–17.