

Т. И. Кузьмина, Т. И. Станиславович

Влияние витрификации на статус хроматина ооцит-кумулюсных комплексов *Sus Scrofa Domesticus*

Аннотация. Успешное решение проблемы сохранения жизнеспособности девитрифицированных донорских ооцитов свиней позволит значительно интенсифицировать инновационные клеточные репродуктивные и ДНК-технологии, благодаря созданию криобанка женских гамет с положительными качественными характеристиками. Создание эффективной модели витрификации и сред для культивирования замороженно-оттаянных ооцит-кумулюсных комплексов — важная задача крио- и эмбриотехнологов. Наночастицы высокодисперсного кремнезема (нВДК) обладающие, в силу своих структурных особенностей, рядом важных свойств (высокая сорбционная емкость белков, отсутствие аллергенного и токсического воздействия на клетки, активация репаративных процессов, антиоксидантные эффекты), могут быть предложены в качестве потенциальных составляющих криопротекторов и сред для культивирования девитрифицированных клеток. В исследовании идентифицированы эффекты 0,001% нВДК на статус хроматина нативных и девитрифицированных ооцит-кумулюсных комплексов *Sus Scrofa Domesticus* при культивировании *in vitro*. 0,001% нВДК не оказывали цито- и генотоксического действия как на нативные, так и на девитрифицированные ооцит-кумулюсные комплексы в процессе культивирования, более того, снижали уровень деструктивных процессов (апоптоз, пикноз), спровоцированных воздействием сверхнизких температур (витрификация). Выявлен криопротекторный эффект 0,001% нВДК на девитрифицированные соматические (кумулюс) и половые (ооциты) клетки овариальных фолликулов *Sus Scrofa Domesticus* после процедуры замораживания/оттаивания и культивирования в течение 44 часов. Введение 0,001% нВДК в состав криопротекторных и культуральных сред положительно сказывалось на морфофункциональном состоянии клеток кумулюса после процедуры витрификации и культивирования. Доля клеток с компактным кумулюсом, обработанных 0,001% нВДК, после девитрификации возрастает с 33% до 48%, $P < 0,01$. А доля ооцитов с кумулюсом в высокой степени экспансии после 44 часов культивирования с 0,001% нВДК составила 61% против 39%, $P < 0,05$ в контроле. Использование нВДК в этапах технологии витрификации ооцит-кумулюсных комплексов вызывало снижение доли апоптотических клеток (TUNEL-тест) в кумулюсе с 54% до 35%, $P < 0,05$. Уровень созревших девитрифицированных ооцитов, подвергшихся воздействию нВДК, увеличился с 33% в контроле до 59%, $P < 0,001$. Полученные результаты позволяют рекомендовать использование 0,001% нВДК в этапах технологии витрификации ооцитов свиней.

Ключевые слова: витрификация, ооцит-кумулюсные комплексы, созревание *in vitro*, апоптоз, *Sus Scrofa Domesticus*.

Авторы:

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

Станиславович Татьяна Ивановна — кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологии развития; e-mail: lllfor@mail.ru.

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

Введение. Успешное решение проблемы сохранения жизнеспособности девитрифицированных (заморожено-оттаянных) донорских ооцитов свиней позволит значительно интенсифицировать инновационные клеточные репродуктивные и ДНК-технологии, в т.ч. получение эмбрионов *in vitro*,

клонирование, трансгенез, редактирование генома, создание линий эмбриональных стволовых клеток. Несмотря на длительный период разработки методов криоконсервации гамет животных, успехи в данной области незначительны, за исключением технологии витрификации ооцитов человека,

которая, благодаря достижениям профессора Ку-ваямы, в настоящее время эффективно используется в центрах ЭКО (экстракорпорального оплодотворения) во всем мире [1, 2]. Сложности в создании модели витрификации, обеспечивающей сохранность структурно-функциональных характеристик, не созревших *in vivo* донорских ооцитов, определяются особенностями строения женских гамет [3]. Особой чувствительностью к воздействию сверхнизких температур отличаются ооциты свиней, причиной является высокое содержание в них липидов [4, 5, 6]. Делипидации увеличивает их толерантность к замораживанию [7]. Одним из эффективных подходов к совершенствованию криопротекторных и культуральных сред в технологиях витрификации и экстракорпорального созревания ооцитов представляется использование в их составе наночастиц высокодисперсного кремнезема (нВДК), обеспечивающих, по-видимому, в силу своих структурных особенностей (высокая сорбционная емкость белков, отсутствие аллергенного и токсического воздействия на клетки, активация репаративных процессов, антиоксидантные эффекты), повышение криорезистентности клеток [8, 9, 10]. Рядом исследователей получены данные о положительных эффектах нВДК на показатели жизнеспособности нативных соматических клеток овариальных фолликулов свиней [11, 12], сперматозоидов быков [13, 14], доимплантационное развитие эмбрионов свиней [15]. При культивировании *in vitro* именно tandem ооцит-окружающие его кумулюсные клетки обеспечивают завершение мейотического созревания гаметы и приобретение ею компетентности к дальнейшему оплодотворению. В связи с вышеизложенным, цель настоящего исследования представлена в следующей формулировке: идентифицировать эффекты наночастиц ВДК на статус хроматина нативных и девитрифицированных ооцит-кумулюсных комплексов *Sus Scrofa Domestica* при культивировании *in vitro*.

Условия, материалы и методы исследований.

Ооцит-кумулюсные комплексы аспирировали из фолликулов диаметром от 3 до 8 мм с высоким тургором, широко разветвленной сетью капилляров и прозрачной оболочкой. Только ооциты с гомогенной цитоплазмой и, не менее чем с 5–6-ю слоями кумулюсных клеток использовали для культивирования и витрификации. Витрификацию ооцит-кумулюсных комплексов проводили после их извлечения из фолликулов. Ооциты, предназначенные для витрификации, обрабатывались тремя растворами криопротекторов (КПА), приготовленными на среде ТС-199 с 0,001% наночастицами ВДК и 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС). КПА-1: 0.7 М диметилсульфоксид (ДМСО) + 0.9 М этиленгликоля (ЭГ); КПА-2: 1.4 М ДМСО +

1.8 М ЭГ; КПА-3: 2.8 М ДМСО + 3.6 М ЭГ + 0.65 М трегалозы. Ооцит-кумулюсные комплексы поэтапно экспонировали 30 сек в КПА-1, затем в КПА-2 и 20 секунд в КПА-3. Пайеты с клетками хранили в жидком азоте. Ооцит-кумулюсные комплексы извлекали из пайет не раньше, чем через 60 минут, и помещали в раствор 0,25 М трегалозы в ТС-199 с 10% ФБС (3 минуты) при 37°C, отмывали в 0,19 М (3 минуты), затем в 0,125 М трегалозы (3 минуты), окончательно трижды в ТС-199 с 10% ФБС и наночастицами 0,001% ВДК. Отобранные ооцит-кумулюсные комплексы культивировали при температуре 38,5°C, в атмосфере, содержащей 5% CO₂ в течение 44 часов в среде NCSU 23, дополненной 10 М. Е. хорионического гонадотропина человека, 10 М. Е. хорионического гонадотропина лошади, 10% фолликулярной жидкости (диаметр фолликула 3–6 мм), 10 мкг/мл гентамицина с 10⁶ клеток гранулезы на мл среды из фолликулов диаметром 3–8 мм. Через 20–22 часа проводили смену среды, но уже без гормональных добавок [16]. В опытные группы сред для культивирования добавляли наночастицы 0,001% ВДК (марка А2000С, институт химии поверхности им. Чуйко, НАН Украины). В отборе концентраций руководствовались указанными разработчиками и основывались на данных, представленных нами ранее [6, 12, 15]. Для контроля за состоянием хроматина в ооцитах и кумулюсных клетках готовили сухо-воздушные препараты по методу Тарковского [17]. Определение апоптозов в клетках кумулюса проводили в следующей последовательности: помещали на покрытые poly-L-lysine предметные стекла и подсушивали на воздухе; фиксировали в растворе формалина в течение 30 минут; промывали в PBS (Sigma); помещали на 2 мин. в 10% раствор Тритона X-100 на 0,1% цитрате натрия; отмывали в PBS (Sigma). Затем добавляли к клеткам реактив TUNEL (Kit from Boehringer Mannheim Cat. No. 1684795), и инкубировали в темноте в течение 60 мин. при 37°C. После инкубации клетки отмывали в PBS (Sigma) и инкубировали в 1 мг/мл растворе пропидиум иодида на дистиллированной воде, вновь промывали в PBS (Sigma), оставляли в темноте при комнатной температуре на 1 час, затем помещали в холодильник и хранили в горизонтальном положении до микроскопирования. Образцы анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axio Imager A 2m.

Все использованные в исследовании реагенты, за исключением обозначенных, производства фирмы Sigma-Aldrich. Эксперименты проводили в 3–5 повторностях. Для сравнения результатов использовали критерии χ^2 -тест (статистическая программа Sigma Stat). Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях

значимости: $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$. Структурно-логическая схема экспериментов представлена на рис. 1.

Анализ и обсуждение результатов. Ооцит-кумулюсные взаимодействия при формировании яйцеклетки *in vivo* обеспечивают растущую и созревающую гамету комплексом биологически активных веществ, как продуцируемых клетками кумулюса, так и поступающими из фолликулярной жидкости, которые вовлечены в механизмы мейотического созревания ооцита. В свою очередь, возможность оказывать влияние ооцита на функционирование клеток кумулюса была показана в работах Эппига и др. [18]. Следовательно, морфофункциональное состояние клеток кумулюса при культивировании — важный показатель адекватности системы культивирования условиям интрафолликулярного созревания, а их сохранность после воздействия сверхнизкими температурами обеспечит нормальное функционирование самого ооцита. Трансформация кумулюса в динамике культивирования от компактного к экспандированному (разрыхленному) является косвенным сви-

детельством физиологичности процесса созревания гаметы. Для культивирования отбирают ооциты, окруженные многослойным компактным кумулюсом. Однако, после процедуры витрификации наблюдают резкое увеличение числа ооцитов, лишенных кумулюса, что делает их непригодными для дальнейшего культивирования. В наших исследованиях показано, что введение в состав криопротекторных сред нВДК благоприятно сказывается на сохранности клеток кумулюса. Доля девитрифицированных клеток с компактным кумулюсом при этом возрастает до 48% по сравнению с контролем — 33%, $P < 0,01$, критерий χ^2 (рис. 2.).

Напротив, высокий уровень экспансии клеток кумулюса — один из признаков завершения мейотического созревания ооцита. Введение в состав среды для культивирования нВДК обеспечило значительный рост доли девитрифицированных клеток с высокоэкспандированным кумулюсом по завершении культивирования: 61 против 39%, $P < 0,05$, критерий χ^2 (рис. 3).

Анализ деструктивных процессов в ядрах клеток кумулюса (уровень клеток в состоянии апоптоза

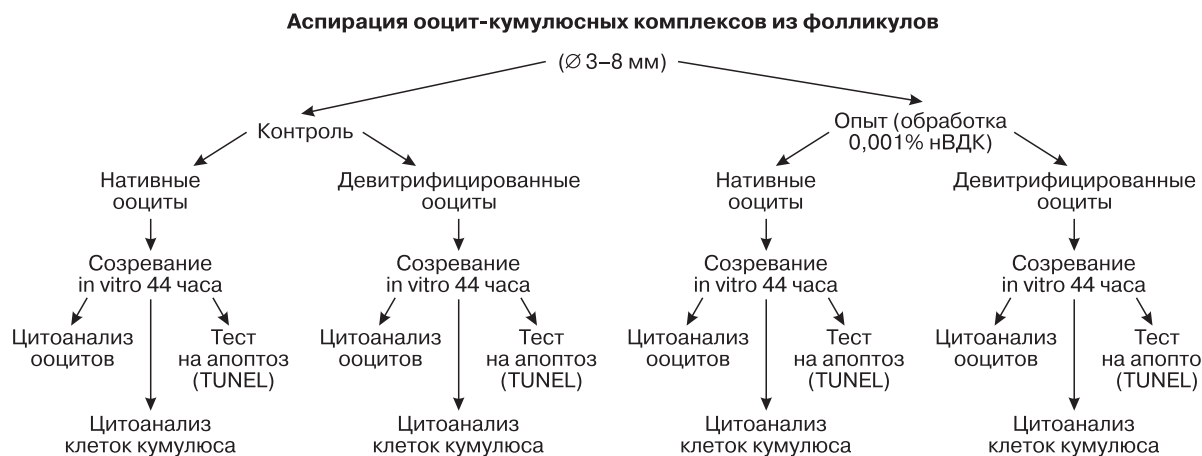


Рис. 1. Оценка показателей криорезистентности ооцит-кумулюсных комплексов свиней

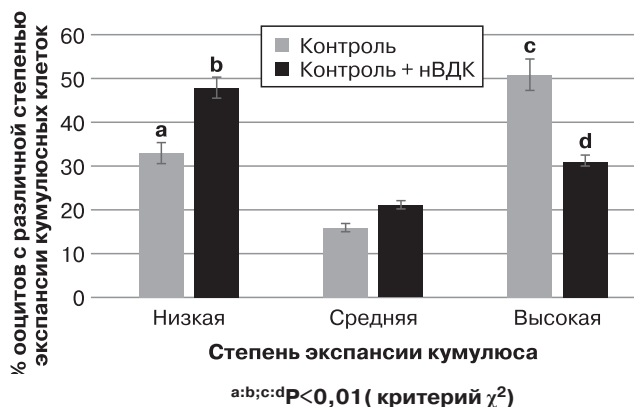


Рис. 2. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на морфологию кумулюса ооцитов свиней после процедуры замораживания/оттаивания (n ооцитов — 374, в 3–5 повторностях)

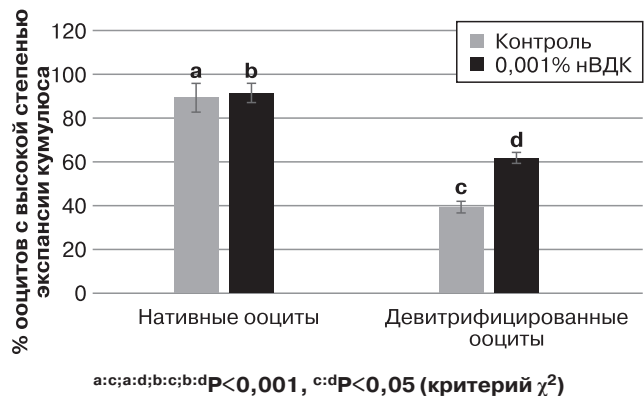


Рис. 3. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на морфологию кумулюса ооцитов свиней (время культивирования — 44 часа, n ооцитов — 397, в 3–5 повторностях)

и пикноза) выявил криопротекторные эффекты нВДК (рис. 4). Так, доля девитрифицированных клеток с пикнотическими ядрами в контрольной группе составила 47%, в опытной снизилась до 29%, $P < 0,05$, критерий χ^2 (рис. 4).

Уровень девитрифицированных кумулюсных клеток в состоянии апоптоза при их культивировании в средах, дополненных наночастицами ВДК, уменьшился с 54 до 35%, $P < 0,05$, критерий χ^2 (рис. 5).

Результаты экспериментов по оценке криорезистентности гамет в условиях применения нВДК подтвердили его криопротекторный эффект на соматические клетки овариальных фолликулов (кумулюс). Выход девитрифицированных ооцитов,

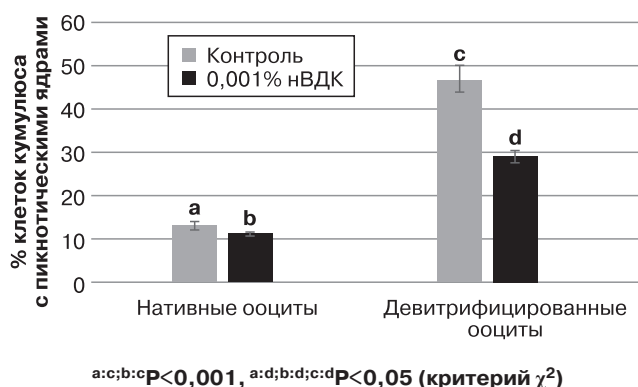


Рис. 4. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на уровень пикнозов в клетках кумулюса свиней (время культивирования — 44 часа, n ооцитов — 131, в 3–5 повторностях)

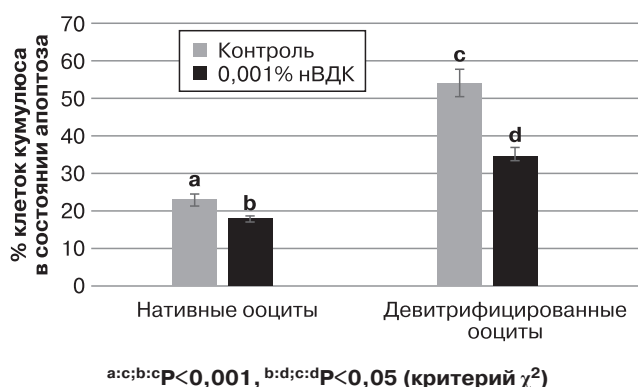


Рис. 5. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на апоптоз в клетках кумулюса свиней (время культивирования — 44 часа, n ооцитов — 260, в 3–5 повторностях)

достигших завершающих стадий мейотического созревания составил в условиях применения нВДК 59% против 33% в контрольной группе $P < 0,001$, критерий χ^2 (рис. 6).

Обобщая полученные результаты, следует отметить, что наночастицы ВДК не оказывали цито- и гено-токсического действия как на нативные, так и на девитрифицированные ооцит-кумулюсные комплексы в процессе культивирования *in vitro*, более того, снижали уровень деструктивных процессов, спровоцированных воздействием сверхнизких температур (витрификация).

Выводы. Выявлен криопротекторный эффект наночастиц высокодисперсного кремнезема на девитрифицированные соматические (кумулюс) и половые (ооциты) клетки овариальных фолликулов *Sus Scrofa Domesticus* после процедуры замораживания/оттаивания и культивирования в течение 44 часов. Введение нВДК в состав криопротекторных и культуральных сред положительно сказывалось на морфофункциональном состоянии клеток кумулюса после процедуры витрификации (замораживание-оттаивание) и культивирования. Криопротекторный эффект выражался также в значительном снижении показателей деструкции хроматина (уровень апоптотических и пикнотических клеток), как в клетках кумулюса, так и в гаметах. Полученные результаты позволяют рекомендовать использование нВДК в технологии витрификации ооцитов свиней.

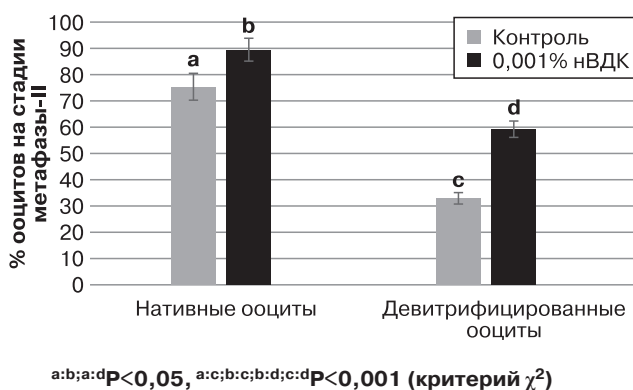


Рис. 6. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на созревание *in vitro* нативных и девитрифицированных ооцитов свиней (время культивирования — 44 часа, n ооцитов — 267, в 3–5 повторностях)

Работа выполнена в соответствии с темой Министерства образования Российской Федерации, номер госрегистрации — АААА-А18-118021590132-9

Литература

1. Khalili M. A. Vitriification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review / M. A. Khalili, A. Shahedi, S. A. Nottola, S. Ashourzadeh, G. Macchiarelli, M. G. Palmerini, J. Assist // *Reprod. Genet.* — 2017. — V. 34. — P. 1413–1426.
2. Kuwayama M. Vitriification of human oocyte // *Reproductive BioMedicine.* — 2010. — V. 20. — P. 538–539.
3. Ogawa B. Developmental ability of porcine in vitro matured oocytes at the meiosis II stage after vitriification / B. Ogawa, S. Ueno, N. Nakayama, H. Matsunari, K. Nakano, T. Fujiwara, Y. Ikezawa, H. Nagashima // *J Reprod Dev.* — 2010. — V. 56. — P. 356–361.
4. Kikuchi K. Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst in vivo and in vitro / K. Kikuchi, H. Ekwall, P. Tienthai, Y. Kawai, J. Noguchi, H. Kaneko and H. Rodriguez-Martinez // *Zygote.* — 2002. — V. 10. — P. 355–366.
5. Novichkova D. Effects of highly dispersed silica nanoparticles on morphology of lipid droplets in growing or fully grown porcine oocytes / D. Novichkova, T. Kuzmina // *Reproduction in Domestic Animals.* — 2018. — V. 53. — P. 173–174.
6. Новичкова Д. А. Воздействие кремнийсодержащих соединений на липидом ооцитов *Sus scrofa domestica* / Д. А. Новичкова, Т. И. Кузьмина, Т. Г. Хонина // *Технологии живых систем.* — 2018. — № 5. — С. 58–63.
7. Nagashima H. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling / H. Nagashima, N. Kashiwazaki, R. J. Ashman, C. G. Grupen, R. F. Seaman, M. B. Nottle // *Biol Reprod.* — 1994. — V. 51. — P. 618–622.
8. Галаган Н. П. Биофункциональные наноматериалы на основе высокодисперсного кремнезема, белка и аминокислот / Н. П. Галаган, Н. Ю. Клименко, И. Л. Орел, Е. А. Новикова, В. В. Туров // *Biopolymers and Cell.* — 2010. — Т. 26(3). — С. 205–213.
9. Геращенко И. И. Мембранотропные свойства наноразмерного кремнезема // *Поверхность.* — 2009. — № 1(16). — С. 288–306.
10. Савченко Д. С. Изучение антиоксидантных свойств нанокompозита высокодисперсного кремнезема с наночастицами серебра / Д. С. Савченко // *Медицина и образование в Сибири.* — 2013. — № 6. — С. 16.
11. Kuzmina T. I. Cytoprotective effect of highly dispersed silica nanoparticles on the viability of granulosa from porcine follicles / T. I. Kuzmina, T. I. Stanislavovich, V. Yu. Kravtsov // *Russian Journal of Developmental Biology.* — 2018. — V. 49. — № 4S. — P. 22–23.
12. Кузьмина Т. И. Воздействие наночастиц высокодисперсного кремнезема на хроматин соматических клеток фолликулов свиньи / Т. И. Кузьмина, Д. А. Новичкова, И. В. Чистякова, О. А. Епишко // *Ветеринария.* — 2017. — № 2. — С. 43–45.
13. Бойцева Е. Н. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на апоптоз сперматозоидов *Bos Taurus* / Е. Н. Бойцева, Н. В. Бычкова, Т. И. Кузьмина // *Цитология.* — 2017. — Т. 59. — № 5. — С. 375–380.
14. Настасієнко Н. С. Дослідження біологічної активності кремнеземів, модифікованих дитатриметилсілільними групами і сорбітом, повідношенню до сперматозоїдів биків методом фотон-кореляційної спектроскопії / Н. С. Настасієнко, П. О. Кузема, Н. П. Галаган, В. А. Покровський // *Фізика живого.* — 2010. — Т. 18. — № 3. — С. 99–106.
15. Зюсюн А. Б. Застосування наноматеріалу в ембріогенетичній системі in vitro отримання ембріонів свиней / А. Б. Зюсюн, О. В. Щербак, О. С. Осипчук, С. І. Ковтун, В. В. Дзіцюк // *Фактори експериментальної еволюції організмів.* — 2015. — Т. 17. — С. 164–168.
16. Кузьмина Т. И. Моделирование систем созревания ооцитов свиней in vitro / Т. И. Кузьмина, Д. А. Новичкова, Н. А. Волкова // *Сельскохозяйственная биология.* — 2013. — № 2. — С. 52–57.
17. Tarkowski A. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs / A. Tarkowski // *Cytogenetic.* — 1966. — V. 1. — P. 394–400.
18. Eppig John J. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development / John J. Eppig, K. Wigglesworth and Frank L. Pendola // *Developmental Biology.* — 2002. — V. 99. — № 5. — P. 2890–2894.

Kuzmina T., Stanislavovich T.

Effect of vitrification on the chromatin status in *Sus Scrofa Domesticus* cumulus-oocyte-complexes

Abstract. Successful solution of the problem of preserving the viability of devitrified donor porcine oocytes will significantly intensify innovative cellular reproductive and DNA technologies by creating cryobanks of female gametes with positive qualitative characteristics. Creation an effective model of vitrification and media for the cultivation of frozen-thawed oocyte-cumulus complexes is an important task of cryo- and embryo-technologists. Highly dispersed silica nanoparticles (nHDS) possess, due to their structural features, a number of important properties (high sorption capacity of proteins, absence of allergenic and toxic effects on cells, activation of reparative processes, antioxidant effects), can be proposed as potential components of cryoprotectants and media for culturing devitrified cells. The effects of 0.001% nHDS on the chromatin status of native and devitrified *Sus Scrofa Domesticus* cumulus -oocyte complexes during in vitro culture have identified. 0.001% nHDS had not cyto- and genotoxic effects on both native and devitrified oocyte-cumulus complexes during cultivation, moreover, they reduced the level of destructive processes (apoptosis, pycnosis) provoked by ultralow temperatures (vitrification). A cryoprotective effect of 0.001% nHDS on devitrified somatic (cumulus) cells and gametes of *Sus Scrofa Domesticus* ovarian follicles after the freezing / thawing and cultivation during 44 hours was detected. The addition of 0.001% nHDS into cryoprotective and culture media had a positive effect on the morpho-functional state of cumulus cells after the vitrification and cultivation procedure. The proportion of cells with compact cumulus treated with 0.001% nHDS after devitrification increases from 33% to 48%, $P < 0,01$. The level of oocytes with cumulus in a high degree of expansion after 44 hours of cultivation with 0.001% nHDS was 61% vs 39%, $P < 0,05$, in control. The use of nHDS in the steps of the cumulus- oocyte- complexes vitrification procedure caused a decrease in the proportion of apoptotic cells (TUNEL-test) in the cumulus from 54% to 35%, $P < 0,05$. The level of matured devitrified oocytes treated with 0.001% nHDS before culture increased from 33% control to 59%, $P < 0,001$. The obtained results allow us to recommend the use of 0.001% nHDS in the steps of porcine oocytes vitrification technology.

Key words: vitrification, cumulus — oocyte- complexes, in vitro maturation, apoptosis, *Sus Scrofa Domesticus*.

Authors:

Kuzmina T. — Doctor Habil. (Biol. Sci.), Professor, Head of the Laboratory of Developmental Biology; e-mail: prof.kouzmina@mail.ru.

Stanislavovich T. — PhD (Biol. Sci.), Leading researcher Laboratory of Developmental Biology; e-mail: lllfor@mail.ru.

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L. K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry. St. Petersburg, Russia, 196601 Moscow highway, 55a.

References

1. Khalili M.A. Vitrification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review / M.A. Khalili, A. Shahedi, S.A. Nottola, S. Ashourzadeh, G. Macchiarelli, M.G. Palmerini, J. Assist // *Reprod. Genet.* — 2017. — V. 34. — P. 1413–1426.
2. Kuwayama M. Vitrification of human oocyte // *Reproductive BioMedicine.* — 2010. — V. 20. — P. 538–539.
3. Ogawa B. Developmental ability of porcine in vitro matured oocytes at the meiosis II stage after vitrification / B. Ogawa, S. Ueno, N. Nakayama, H. Matsunari, K. Nakano, T. Fujiwara, Y. Ikezawa, H. Nagashima // *J Reprod Dev.* — 2010. — V. 56. — P. 356–361.
4. Kikuchi K. Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst in vivo and in vitro / K. Kikuchi, H. Ekwall, P. Tienthai, Y. Kawai, J. Noguchi, H. Kaneko and H. Rodriguez-Martinez // *Zygote.* — 2002. — V. 10. — P. 355–366.

5. Novichkova D. Effects of highly dispersed silica nanoparticles on morphology of lipid droplets in growing or fully grown porcine oocytes / D. Novichkova, T. Kuzmina // *Reproduction in Domestic Animals*. — 2018. — V. 53. — P. 173–174.
6. Novichkova D. A. Effect of silicon-containing compounds on the oocyte lipid of *Sus scrofa domestica* / D. A. Novichkova, T. I. Kuzmina, T. G. Khonin // *Technologies of living systems*. — 2018. — № 5. — P. 58–63.
7. Nagashima H. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling / H. Nagashima, N. Kashiwazaki, R.J. Ashman, C.G. Grupen, R. F. Seamark, M. B. Nottle // *Biol Reprod*. — 1994. — V. 51. — P. 618–622.
8. Galagan N. P. Biofunctional nanomaterials based on highly dispersed silica, protein and amino carbohydrates / N. P. Galagan, N. Yu. Klimenko, I. L. Orel, E. A. Novikova, V. V. Tours // *Biopolymers and Cell*. — 2010. — T. 26 (3). — P. 205–213.
9. Gerashchenko I. I. Membranotropic properties of nano-sized silica / I. I. Gerashchenko // *Surface*. — 2009. — № 1. (16). — P. 288–306.
10. Savchenko D. S. Study of the antioxidant properties of a nanocomposite of highly dispersed silica with silver nanoparticles // *Medicine and Education in Siberia*. — 2013. — № 6. — P. 16.
11. Kuzmina T. I. Cytoprotective effect of highly dispersed silica nanoparticles on the viability of granulosa from porcine follicles / T. I. Kuzmina, T. I. Stanislavovich, V. Yu. Kravtsov // *Russian Journal of Developmental Biology*. — 2018. — V. 49. — № 4S. — P. 22–23.
12. Kuzmina T. I. Effect of highly dispersed silica nanoparticles on chromatin of somatic cells of pig follicles / T. I. Kuzmina, D. A. Novichkova, I. V. Chistyakova, O. A. Epishko // *Veterinary Medicine*. — 2017. — № 2. — P. 43–45.
13. Boitseva E. N. The effect of nanoparticles of highly dispersed silica on apoptosis of *Bos Taurus* spermatozoa / E. N. Boytseva, N. V. Bychkova, T. I. Kuzmina // *Cytology*. — 2017. — T. 59. — № 5. — P. 375–380.
14. Nastasienko N. S. Dedication of biologic activity of silica, modified data trimethyl groups by sorbite, before spermatozoa bikiv by photon-correlating spectroscopy / N. S. Nastasienko, P. O. Kuzema, N. P. Galagan, V. A. Pokrovsky // *Fizika living*. — 2010. — T. 18. — № 3. — P. 99–106.
15. Zyuzyun A. B. Zatosuvannya nanomaterial in the embryogenetic systems in vitro from the pig embryos / A. B. Zyuzun, O. V. Scherbak, O. S. Osipchuk, S. I. Kovtun, V. V. Dzytsyuk // *Factor of Experimental Evolution Organs*. — 2015. — T. 17. — P. 164–168.
16. Kuzmina T. I. Simulation of pig oocyte maturation systems in vitro / T. I. Kuzmina, D. A. Novichkova, N. A. Volkova // *Agricultural Biology*. — 2013. — № 2. — P. 52–57.
17. Tarkowski A. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs / A. Tarkowski // *Cytogenetic*. — 1966. — V. 1. — P. 394–400.
18. Eppig John J. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development / John J. Eppig, K. Wigglesworth and Frank L. Pendola // *Developmental Biology*. — 2002. — V. 99. — № 5. — P. 2890–2894.