

<https://doi.org/10.31043/2410-2733-2021-1-3-8>
УДК 636.2:591.39

Г. Н. Сингина, И. Ю. Лебедева, Е. Н. Шедова, Е. В. Цындрина

Оценка качества и устойчивости к возрастным изменениям ооцитов коров при созревании в однофазной и двухфазной системах культивирования

Аннотация.

Цель: изучение степени созревания и состояния хромосом в зрелых и стареющих ооцитах коров, созревающих в однофазной (1-фазной) и двухфазных (2-фазных) системах культивирования, а также оценка влияния эндогенного прогестерона на завершающем этапе созревания на данные показатели.

Материалы и методы. В данной работе проведено сравнительное исследование ядерного созревания и аномального изменения хромосом на стадии MII в ооцитах коров, созревающих в 1-фазной и различных 2-фазных системах IVM (in vitro maturation, созревание in vitro). Кроме того, впервые изучено влияние исследуемых условий на качество хромосом в процессе последующего старения зрелых яйцеклеток. При использовании 1-фазной системы IVM ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) культивировали в течение 24 ч в среде ТС-199, которая содержала 10% фетальную бычью сыворотку (ФБС), 10 мкг/мл фолликулостимулирующего (ФСГ) и 10 мкг/мл лютеинизирующего (ЛГ) гормонов. В 2-фазной системе ооциты созревали в тех же условиях в течение первых 16 ч, а затем в новой среде (ТС-199, содержащей 10% ФБС (контроль), или в этой же среде, дополненной 50 нг/мл прогестерона) в течение оставшихся 8 ч. После созревания в 1-фазной и 2-фазной системах часть ОКК переносили в среду старения (ТС-199, содержащую 10% ФБС) и дополнительно культивировали еще 24 часа. Состояние ядерного материала (стадия мейоза и аномальные изменения MII-хромосом) в зрелых и стареющих ооцитах оценивали с помощью цитогенетического анализа.

Результаты. Доля созревших ооцитов, находящихся на стадии MII мейоза через 24 ч созревания была сходной после 1-фазного и 2-фазного IVM и составила 82,7–86,3%. Кроме того, не выявлено влияния системы культивирования на долю MII-ооцитов с аномальными изменениями хромосом. Для 1-фазного культивирования данный показатель непосредственно после завершения периода IVM составил $32,2 \pm 0,5\%$ и для 2-фазного $38,5 \pm 4,0\%$. При последующем старении ооцитов он возрастал до $56,9 \pm 2,9$ и $68,4 \pm 3,0\%$ соответственно. Эндогенный прогестерон в среде IVM (в течение последних 8 ч) также не влиял на степень завершения ядерного созревания, но снижал долю ооцитов с аномальными изменениями хромосом: после IVM как по сравнению с контролем, так и по сравнению с 1-фазным протоколом; после 24-часового пролонгированного культивирования по сравнению с контролем ($P < 0,05$).

Заключение. Полученные данные позволяют сделать вывод, что двухфазная система созревания ооцитов коров может применяться как альтернатива общепринятому протоколу IVM, и что прогестерон во второй фазе IVM обуславливает повышение качества яйцеклеток и их устойчивость к возрастным трансформациям.

Ключевые слова: ооциты коров; созревание in vitro; старение; прогестерон.

Авторы:

Сингина Галина Николаевна — кандидат биологических наук; e-mail: g_singina@mail.ru;

Лебедева Ирина Юрьевна — доктор биологических наук; e-mail: irledv@mail.ru;

Шедова Екатерина Николаевна — e-mail: shedvek@yandex.ru;

Цындрина Евгения Валериевна — e-mail: vip.kirilochkina@mail.ru.

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ им. академика Л. К. Эрнста; 142132, Россия, Московская обл., городской округ Подольск, пос. Дубровицы, 60.

Введение. Получение эмбрионов *in vitro* (*in vitro* embryo production, IVP) имеет широкие перспективы применения в научных исследованиях, а также служит одним из способов поддержания воспроизводства стада в молочном скотоводстве [1–3]. К настоящему времени достигнут существенный прогресс в разработке IVP технологии у крупного рогатого скота, однако полноценность эмбрионов, развившихся *in vitro*, по-прежнему значительно ниже, чем *in vivo*. При этом основным лимитирующим фактором, влияющим на получение IVP эмбрионов, является качество ооцитов, приобретаемое в процессе их созревания *in vitro* (*in vitro* maturation, IVM) [1–3].

В стандартной практике модернизация культуральных систем направлена в первую очередь на моделирование условий, имеющих место *in vivo* внутри овариальных фолликулов [4–6]. Однако используемые подходы, как правило, учитывают только изменения, происходящие в функциональном состоянии ооцитов в процессе их созревания. Вместе с тем *in vivo* и *in vitro* в ооцитах млекопитающих, включая коров, после завершения первого деления мейоза активизируются процессы старения, которые негативно влияют на качество созревших яйцеклеток и их компетенцию к эмбриональному развитию [7, 8]. Кроме того, соматические клетки кумулюса, окружающие ооциты, подвергаются апоптотической дегенерации при завершении созревания женских гамет и могут ускорять негативные изменения последних, связанные со старением [8, 9].

К настоящему времени выявлен ряд функциональных изменений, ассоциированных с процессом старения ооцитов коров, в том числе повышение предрасположенности к партеногенезу и апоптозу, а также возрастание частоты хромосомных нарушений [8]. Данные изменения в культивируемых яйцеклетках могут возникать до момента их активации и негативно влиять на последующее качество эмбрионов, что свидетельствует о необходимости исследования механизмов, контролирующих данные процессы в условиях *in vitro* [10].

Чаще всего для созревания ооцитов коров *in vitro* используется однофазное культивирование. Однако данный подход не учитывает тот факт, что в период экстракорпорального созревания ооцитов млекопитающих существует временная несогласованность (асинхронность) между ядерными и цитоплазматическими преобразованиями, и что основные цитоплазматические изменения, от которых в конечном итоге зависит способность ооцитов к эмбриональному развитию, происходят не на начальном, а на завершающем этапе IVM, следовательно существует необходимость изуче-

ния специфических потребностей женских гамет именно в этот период, в том числе и с учетом возможных возрастных трансформаций. В частности, известно, что эндогенный прогестерон играет важную роль в регуляции качества ооцитов как *in vitro*, так и *in vivo*. Наиболее значимые изменения в кинетике этих процессов происходят во второй фазе созревания [11–13]. Вместе с тем вопрос о влиянии прогестерона во время завершения созревания ооцитов на их последующую устойчивость к возрастным трансформациям остается открытым. Нет также информации о роли данного гормона в аналогичных условиях в регуляции ядерного созревания ооцитов.

Цель исследований — изучение степени созревания и состояния хромосом в зрелых и стареющих ооцитах коров, созревающих в однофазной и двухфазных системах культивирования, а также оценка влияния эндогенного прогестерона на завершающем этапе созревания на данные показатели.

Материалы и методы. Для экспериментов выделенные *post mortem* яичники коров доставляли в лабораторию, освобождали от прилегающих тканей и многократно отмывали в стерильном физиологическом растворе с антибиотиками (пенициллин — 100 МЕ/мл, стрептомицин — 50 мкг/мл). Ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) выделяли из яичников, рассекая стенки фолликулов лезвием, промывали в среде ТС199, которая содержала 10% фетальную бычью сыворотку (ФБС), гепарин (10 мкг/мл) и гентамицин (50 мкг/мл), и проводили морфологическую оценку извлеченных ОКК. Для дальнейшего культивирования использовали ооциты округлой формы, с гомогенной цитоплазмой, равномерной по ширине зоной пеллюцида, окруженные многослойным компактным кумулюсом. Все манипуляции с ооцитами осуществляли под стереомикроскопом SMZ (Nikon, Япония) при 37°C.

Отобранные по качеству ОКК культивировали с целью созревания группами в 500 мкл среды при температуре 38,5 °C и 5% CO₂ в атмосфере. Для получения созревших ооцитов применяли однофазную и двухфазную системы культивирования. При использовании однофазной системы ОКК культивировали в течение 24 ч в среде ТС-199, содержащей 10% ФБС, 1 мМ пирувата натрия, 50 мкг/мл гентамицина, 10 мкг/мл ФСГ и 10 мкг/мл ЛГ. В двухфазной системе ооциты созревали в тех же условиях в течение первых 16 ч. Затем ОКК пересаживали в новую среду и культивировали в течение последующих 8 ч в присутствии или в отсутствии (контроль) прогестерона. После IVM в однофазной и двухфазной си-

стемах культивирования ОКК либо были сразу использованы для анализа уровня ядерного созревания, либо перенесены в среду старения еще на 24 часа, с последующей оценкой степени дегенерации метафазных хромосом. На втором этапе двухфазного культивирования, а также пролонгированном культивировании применяли среду ТС-199, содержащую 10% ФБС, 1 мМ пирувата натрия и 50 мкг/мл гентамицина.

Для анализа состояния ядерного материала ооциты освобождали от прилегающих клеток и помещали на 5–10 мин в раствор цитрата натрия. Затем клетки переносили на сухое обезжиренное стекло, фиксировали смесью метанола и уксусной кислоты (1:3) и окрашивали по Романовскому-Гимза. Цитогенетическую оценку состояния хромосом в ооцитах (стадия мейоза, наличие деструктивных изменений в морфологии М-II хромосом) проводили под световым микроскопом Axio Imager.M2 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении 1000х в соответствии с известными морфологическими критериями. К деструктивным изменениям метафазных хромосом относили следующие морфологические аномалии: деспирализацию и потерю четких очертаний, частичное слипание с образованием единой комковатой массы, а также фрагментацию [8].

Опыты по культивированию ооцитов выполняли в 3 независимых повторностях, общее число ОКК в каждой экспериментальной группе составляло не менее 61 шт. Полученные данные обрабатывали методом one-way ANOVA в программе SigmaStat. Для оценки достоверности различий между сравниваемыми средними значениями использовали критерий Тьюки (Tukey's test).

Результаты и обсуждение. Экстракорпоральное созревание ооцитов — важный этап технологии получения эмбрионов *in vitro*, оптимизацией которого можно существенно повысить ее эффективность [4]. В представленной работе наряду однофазным культивированием ооцитов коров в среде ТС-199, содержащей 10% ФБС и гонадотропные гормоны, мы использовали двухфазный протокол IVM, который предполагал их созревание в последние 8 ч в аналогичной среде, но без гормонов. Кроме того, была модифицирована вторая фаза IVM посредством внесения прогестерона. В целом проведена сравнительная оценка влияния исследуемых условий на ядерное созревание (достижение метафазы второго деления мейоза и состояние хромосом), являющегося определяющим фактором способности ооцитов к оплодотворению и последующему эмбриональному развитию, а также на нивелирование возрастных трансформаций в зрелых ооцитах в про-

цессе последующего пролонгированного культивирования.

Через 24 ч IVM доля ооцитов, находящихся на стадии МII мейоза, была сходной для 1-фазного и 2-фазного культивирования и составила $86,3 \pm 4,9$ и $82,7 \pm 7,0\%$, соответственно (рис. 1). Не выявлено влияния системы культивирования на качество ядерного материала яйцеклеток. По завершению 1-фазного культивирования доля МII-ооцитов с аномальными изменениями хромосом равнялась $32,2 \pm 0,5\%$. Перенос ооцитов через 16 ч созревания из среды, содержащей гонадотропные гормоны, в среду, лишенную гормонов (контроль, 2-фазная система), не изменял данный процент ($38,5 \pm 4,0\%$), а следовательно, не ухудшал качество яйцеклеток (рис. 2А).

В условиях *in vitro* ооциты, выделенные из разных фолликулов яичников, от различных коров доноров, представляют собой гетерогенную популяцию, которая имеет разный потенциал к развитию в процессе созревания *in vitro*. В результате культивирования *in vitro* часть ооцитов может созреть (достигать стадии метафазы II мейоза) значительно раньше, чем наступает период оплодотворения *in vitro*, что приводит к более раннему их старению, а также потере ими качества по сравнению с остальной популяцией созревающих клеток [14]. В данной работе для изучения изменений, связанных со старением ооцитов, нами была использована модель пролонгированного культивирования [15], согласно которой ОКК после периода созревания *in vitro* были перенесены в среду старения еще на 24 часа. Цитологический анализ показал, что в случае 1-фазного IVM доля МII-ооцитов с аномалиями хромосом через 24 часа дополнительной инкубации была значительно выше, чем непосредственно после завершения ими периода созревания в аналогичных условиях и достигала $56,9 \pm 2,9\%$ ($P < 0,001$). Использование 2-х фазного протокола не изменяло данную тенденцию (рис. 2Б).

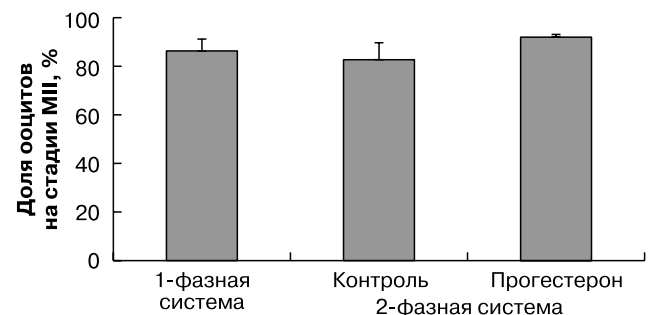
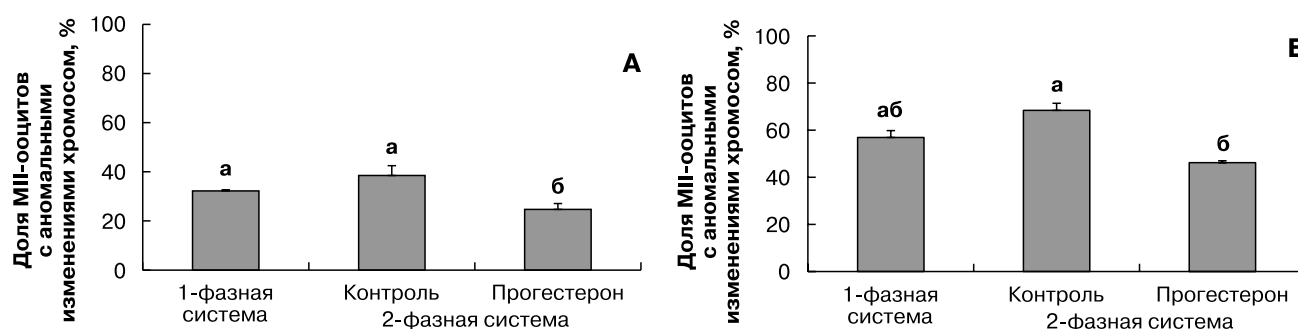


Рис. 1. Уровень ядерного созревания после 1-фазного и 2-фазного (в отсутствие (контроль) или в присутствии прогестерона) культивирования ооцитов коров в условиях *in vitro*



* *Примечание:* $P < 0,05$ — достоверность различий между сравниваемыми группами обозначенные разными буквами.

Рис. 2. Состояние хромосом в ооцитах коров после 1-фазного и 2-фазного (в отсутствие (контроль) или в присутствии прогестерона) *in vitro* созревания (А) и последующего старения в течение 24 ч (Б)

Эндогенный прогестерон в среде IVM (в течение последних 8 ч) не влиял на степень завершения ядерного созревания (рис. 1), но снижал долю зрелых ооцитов с аномальными изменениями хромосом (рис. 2А) по сравнению с контролем с $38,5 \pm 4,0\%$ до $24,7 \pm 2,4$ ($P < 0,05$). В этом же случае наблюдалось повышение качества хромосом по сравнению с однофазным протоколом ($24,7 \pm 2,4$ против $32,2 \pm 0,5\%$, $P < 0,05$). Также воздействие прогестерона на дозревающие ооциты во второй фазе культивирования приводило к последующему торможению аномальных изменений метафазных хромосом в течение 24-часового пролонгированного культивирования ОКК (рис. 2Б). Эффект прогестерона при этом был значителен

по сравнению с внутренним контролем ($49,2 \pm 0,8$ против $68,4 \pm 3,0\%$, $P < 0,01$), но не с однофазным протоколом ($49,2 \pm 0,8$ против $56,9 \pm 2,9\%$, $P < 0,05$).

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о том, что двухфазная система созревания ооцитов коров не оказывает негативного влияния на качество яйцеклеток и может рассматриваться как альтернатива общепринятому протоколу IVM. Также результаты демонстрируют, что экзогенный прогестерон во время второй фазы созревания способен повышать качество ооцитов и их резистентность к последующим возрастным изменениям, а следовательно, может быть использован для оптимизации условий созревания ооцитов крупного рогатого скота в двухфазной системе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-29-08035)

Литература

1. Lonergan P. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts / P. Lonergan, T. Fair // *Theriogenology*. — 2008. — Vol. 69. — P. 17–22. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.09.007.
2. Galli C. Bovine embryo technologies / C. Galli, R. Duchi, G. Crotti, P. Turini, N. Ponderato, S. Colleoni, I. Lagutina, G. Lazzari // *Theriogenology*. — 2003. — Vol. 59(2) — P. 599–616. doi: 10.1016/S0093-691X(02)01243-8.
3. Ponsart C. Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle / C. Ponsart, D. Le Bourhis, H. Knijn, S. Fritz, C. Guyader-Joly, T. Ottern, S. Lacaze, F. Charreaux, L. Schibler, D. Dupassieux, E. Mul-laart // *Reproduction, Fertility and Development*. — 2013. — Vol. 26(1). — P. 12–21. doi: 10.1071/RD13328.
4. Wrenzycki C. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes / C. Wrenzycki, H. Stinshoff // *Reprod. Domest. Anim.* — 2013. — Vol. 48 (Suppl. 1). — P. 38–43. doi: 10.1111/rda.12204.
5. Thompson J. G. Metabolism of the bovine cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence / J. G. Thompson, M. Lane, R. B. Gilchrist // *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* — 2007. — Vol. 64. — P. 179–190.
6. Sudiman J. Bone morphogenetic protein 15 in the pro-mature complex form enhances bovine oocyte developmental competence / J. Sudiman, M. L. Sutton-McDowall, L. J. Ritter, M. A. White, D. G. Mottershead, J. G. Thompson, R. B. Gilchrist // *PLoS ONE*. — 2014. — Vol. 9(7). — e103563. doi: 10.1371/journal.pone.0103563.
7. Takahashi T. Cellular and molecular mechanisms of various types of oocyte aging / T. Takahashi, H. Igarashi, M. Amita, S. Hara, H. Kurachi // *Reproductive Medicine and Biology*. — 2011. — Vol. 10(4). — P. 239–249. doi: 10.1007/s12522-011-0099-0.

8. Lebedeva I. Yu. Dynamics of morphofunctional changes in aging bovine ova during prolonged culture in vitro / I. Yu. Lebedeva, G. N. Singina, A. V. Lopukhov, N. A. Zinovieva // Cell and Tissue Biology. — 2014. — Vol. 8(3). — P. 258–266. doi: 10.1134/S1990519X14030080.
9. Kong Q. Q. Cumulus cell released tumor necrosis factor (TNF)- α promotes post-ovulatory aging of mouse oocytes / Q. Q. Kong, J. Wang, B. Xiao, F. H. Lin, J. Zhu, G. Y. Sun, M. J. Luo, J. H. Tan // Aging (Albany NY). — 2018. — Vol. 10(7). — P. 1745–1757. doi: 10.18632/aging.101507.
10. Singina G. Pole of pituitary hormones and cumulus cells in modulating the developmental capacity of aging bovine oocytes / G. Singina, I. Lebedeva, T. Taradajnic, N. Zinovieva // Reproduction, Fertility and Development. — 2015. — Vol. 27(1) — P. 204.
11. Mingoti G. Z. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids / G. Z. Mingoti, J. M. Garcia, A. A. Rosa-e-Silva // Anim. Reprod. Sci. — 2002. — Vol. 69. — P. 175–186. doi: 10.1016/S0378-4320(01)00187-7.
12. Tosca L. Possible role of 5'AMP-activated protein kinase in the metformin-mediated arrest of bovine oocytes at the germinal vesicle stage during in vitro maturation / L. Tosca, S. Uzbekova, C. Chabrolle, J. Dupont // Biol. Reprod. — 2007. — Vol. 77(3). — P. 452–465. doi: 10.1095/biolreprod.107.060848.
13. Fair T. The role of progesterone in oocyte acquisition of developmental competence / T. Fair, P. Lonergan // Reprod. Domest. Anim. — 2012. — Vol. 47 (Suppl. 4). — P. 142–147. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02068.x.
14. Takahashi T. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: mini review. / T. Takahashi, H. Igarashi, M. Amita, S. Hara, K. Matsuo, H. Kurachi // J. Obstet. Gynaecol. Re. — 2013. — Vol. 39(10) — P. 1431–1439. doi: 10.1111/jog.12111.
15. Miao Y. L. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility / Y. L. Miao, K. Kikuchi, Q. Y. Sun, H. Schatten // Hum. Reprod. — 2009. — Vol. 15. — P. 573–585. doi: 10.1093/humupd/dmp014.

Singina G., Shedova E., Lebedeva I., Tsyndrina E.

Assessment of bovine oocytes quality and their resistance to age-related changes after maturation in single-phase and two-phase culture systems

Abstract. Existing approaches to in vitro maturation (IVM) of bovine oocytes do not take into account their specific demands during terminal phase of IVM including the need for increasing of their resistance to age-related changes. In this work, we performed for the first time a comparative investigation of nuclear maturation and abnormal changes of MII chromosomes in bovine oocytes after their maturation in single-phase system and different two-phase systems and after the subsequent prolonged culture of the ova. When using the single-phase system, cumulus-oocyte complexes (COCs) were cultured for 24 h in the medium TCM 199 containing 10% fetal bovine serum (FBS), 10 μ g/ml FSH, and 10 μ g/ml luteinizing hormone (LH). In the two-phase system, oocytes matured in the same conditions for first 16 h and then in a new medium (TCM 199 containing 10% FBS [Control] or the same medium supplemented with 50 ng/ml progesterone) for the remaining 8 h of IVM. After maturation in the single-phase and the two-phase systems, a part of COCs were transferred to an aging medium (TCM 199 containing 10% FBS) and further cultured for 24 h. The state of the nuclear material (stage of meiosis and abnormal changes of MII chromosomes) in the matured and aged oocytes was assessed using cytogenetic analysis. The rate of oocytes being at the MII stage of meiosis after IVM in the single-phase and the two-phase systems was similar and amounted 82.7–86.3%. In addition, no effect of the culture system on the rate of MII oocytes with abnormal morphology of chromosomes was revealed. For the single-phase culture, this rate after the end of the IVM period was $32.2 \pm 0.5\%$ and for the two-phase systems culture $38.5 \pm 4.0\%$. The prolonged culture of matured oocytes led to an increase the frequency of destructive changes in MII chromosomes to 56.9 ± 2.9 and $68.4 \pm 3.0\%$, respectively. Progesterone in the IVM medium (during the last 8 hours) also did not effect on the rate of nuclear maturation, but reduced the rate of oocytes with abnormal changes in chromosomes: after IVM, as compared with the Control and the two-phase system; after 24-hours prolonged culture as compared to control ($P < 0.05$). The results of the study suggest that the two-phase maturation of bovine oocytes may be used as an alternative to the conventional IVM protocol and that progesterone during the second phase of IVM causes an increase in the quality of ova and their resistance to subsequent age-related transformations.

Keywords: bovine oocytes, in vitro maturation, aging, progesterone.

Authors:

Singina G. — PhD (Biol. Sci.); e-mail: g_singina@mail.ru;

Shedova E. — e-mail: shedvek@yandex.ru;

Lebedeva I. — Dr. Habil. (Bio. Sci); e-mail: irledv@mail.ru;

Tsyndrina E. — e-mail: vip.kirilochkina@mail.ru.

L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry; Russia, Moscow Region, Podolsk Municipal District, Dubrovitsy 60, 142132.

References

1. Lonergan P. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts / P. Lonergan, T. Fair // *Theriogenology*. — 2008. — Vol. 69. — P. 17–22. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.09.007.
2. Galli C. Bovine embryo technologies / C. Galli, R. Duchi, G. Crotti, P. Turini, N. Ponderato, S. Colleoni, I. Lagutina, G. Lazzari // *Theriogenology*. — 2003. — Vol. 59(2) — P. 599–616. doi: 10.1016/S0093-691X(02)01243-8.
3. Ponsart C. Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle / C. Ponsart, D. Le Bourhis, H. Knijn, S. Fritz, C. Guyader-Joly, T. Ottern, S. Lacaze, F. Charreaux, L. Schibler, D. Dupassieux, E. Mullaart // *Reproduction, Fertility and Development*. — 2013. — Vol. 26(1). — P. 12–21. doi: 10.1071/RD13328.
4. Wrenzycki C. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes / C. Wrenzycki, H. Stinshoff // *Reprod. Domest. Anim.* — 2013. — Vol. 48 (Suppl. 1). — P. 38–43. doi: 10.1111/rda.12204.
5. Thompson J. G. Metabolism of the bovine cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence / J. G. Thompson, M. Lane, R. B. Gilchrist // *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* — 2007. — Vol. 64. — P. 179–190.
6. Sudiman J. Bone morphogenetic protein 15 in the pro-mature complex form enhances bovine oocyte developmental competence / J. Sudiman, M. L. Sutton-McDowall, L. J. Ritter, M. A. White, D. G. Mottershead, J. G. Thompson, R. B. Gilchrist // *PLoS ONE*. — 2014. — Vol. 9(7). — e103563. doi: 10.1371/journal.pone.0103563.
7. Takahashi T. Cellular and molecular mechanisms of various types of oocyte aging / T. Takahashi, H. Igarashi, M. Amita, S. Hara, H. Kurachi // *Reproductive Medicine and Biology*. — 2011. — Vol. 10(4). — P. 239–249. doi: 10.1007/s12522-011-0099-0.
8. Lebedeva I. Yu. Dynamics of morphofunctional changes in aging bovine ova during prolonged culture in vitro / I. Yu. Lebedeva, G. N. Singina, A. V. Lopukhov, N. A. Zinovieva // *Cell and Tissue Biology*. — 2014. — Vol. 8(3). — P. 258–266. doi: 10.1134/S1990519X14030080.
9. Kong Q. Q. Cumulus cell released tumor necrosis factor (TNF)- α promotes post-ovulatory aging of mouse oocytes / Q. Q. Kong, J. Wang, B. Xiao, F. H. Lin, J. Zhu, G. Y. Sun, M. J. Luo, J. H. Tan // *Aging (Albany NY)*. — 2018. — Vol. 10(7). — P. 1745–1757. doi: 10.18632/aging.101507.
10. Singina G. Pole of pituitary hormones and cumulus cells in modulating the developmental capacity of aging bovine oocytes / G. Singina, I. Lebedeva, T. Taradajnic, N. Zinovieva // *Reproduction, Fertility and Development*. — 2015. — Vol. 27(1) — P. 204.
11. Mingoti G. Z. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids / G. Z. Mingoti, J. M. Garcia, A. A. Rosa-e-Silva // *Anim. Reprod. Sci.* — 2002. — Vol. — 69. P. 175–186. doi: 10.1016/S0378-4320(01)00187-7.
12. Tosca L. Possible role of 5'AMP-activated protein kinase in the metformin-mediated arrest of bovine oocytes at the germinal vesicle stage during in vitro maturation / L. Tosca, S. Uzbekova, C. Chabrolle, J. Dupont // *Biol. Reprod.* — 2007. — Vol. 77(3). — P. 452–465. doi: 10.1095/biolreprod.107.060848.
13. Fair T. The role of progesterone in oocyte acquisition of developmental competence / T. Fair, P. Lonergan // *Reprod. Domest. Anim.* — 2012. — Vol. 47 (Suppl. 4). — P. 142–147. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02068.x.
14. Takahashi T. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: mini review. / T. Takahashi, H. Igarashi, M. Amita, S. Hara, K. Matsuo, H. Kurachi // *J. Obstet. Gynaecol. Re.* — 2013. — Vol. 39(10) — P. 1431–1439. doi: 10.1111/jog.12111.
15. Miao Y. L. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility / Y. L. Miao, K. Kikuchi, Q. Y. Sun, H. Schatten // *Hum. Reprod.* — 2009. — Vol. 15. — P. 573–585. doi: 10.1093/humupd/dmp014.