

Модификация этапов технологии интраовариальной витрификации ооцитов *Sus Scrofa Domesticus*

Т. И. Станиславович[✉], Т. И. Кузьмина¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального научного центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста (ВНИИГРЖ), Пушкин, Россия

[✉]E-mail: lllfor@mail.ru

Аннотация. Интраовариальная витрификация ооцитов сельскохозяйственных животных на сегодняшний день является весьма перспективным направлением. Отдельные этапы этого способа, прежде всего, состав криопротекторных растворов, требуют дальнейшего совершенствования. Витрификация фрагментов яичников (ФЯ) позволяет сохранять примордиальные фолликулы, структура которых более устойчива в силу отсутствия фолликулярной жидкости, к деструктивным процессам, провоцируемым воздействием сверхнизких температур. Высокий репродуктивный потенциал свиней обусловлен их физиологическими особенностями. Кремний является вторым по содержанию микроэлементом, а соединения на его основе все чаще применяются в фармакологии, ветеринарии, клинической практике. Диметилглицеролаты кремния (ДМГК) характеризуются антимикробным, ранозаживляющим и противовоспалительным действиями. Наличие компактного кумулюса, окружающего ооцит, является одним из важных показателей компетентности женской гаметы к экстрафолликулярному созреванию. **Цель исследования** – оценить перспективные потенциалы ДМГК как криопротекторного агента в технологии интраовариальной витрификации ооцит-кумулясных комплексов свиней. **Методы.** Фрагменты яичников свиней (15×20 мм) до витрификации экспонировали в течение 25 мин. и 15 мин. последовательно в растворах криопротекторов следующего состава: 1 – 7,5 % этиленгликоль (ЭГ), 7,5 % диметилсульфоксид (ДМСО), 65 % фосфатно-солевой буфер (ФСБ), 20 % фетальная бычья сыворотка (ФБС); 2 – 20 % ЭГ, 20 % ДМСО, 60 % ФСБ, 0,5 моль/л сахарозы. Опытная группа обрабатывалась в течение 10 мин. в растворе фосфатно-солевого буфера с 0,2 % ДМГК. Для оценки статуса хроматина использовали Hoechst 33258, образцы анализировали на микроскопе ZEISS Axiolmager A 2 m. **Результаты исследования.** Инкубирование фрагментов яичников свиней в растворе, содержащем 0,2 % ДМГК перед витрификацией, а также введение 0,2 % ДМГК в состав сред для созревания ооцитов оказало положительное влияние на морфологию клеток кумулюса (степень экспансии) после процедуры оттаивания. Доля девитрифицированных клеток с компактным кумулюсом, предварительно обработанных 0,2 % ДМГК, увеличилась по сравнению с контрольной группой с 56 % до 64 %, ($P < 0,05$, критерий χ^2). Уровень ооцитов с кумулюсом с высокой степенью экспансии после 44 часов культивирования с 0,2 % ДМГК составил в опытной группе 75 % против 54 % в контрольной группе, ($P < 0,05$, критерий χ^2). Использование ДМГК при культивировании девитрифицированных ооцит-кумулясных комплексов свиней в течение 44 часов увеличило долю созревших ооцитов с 41 % в контрольной группе до 64 % в опытной группе, ($P < 0,05$, критерий χ^2). **Научная новизна.** Модернизированы этапы технологии интраовариальной витрификации ооцитов свиней путем превентивной инкубации фрагментов яичников в растворе 0,2 % ДМГК и введением его в среды для культивирования ооцит-кумулясных комплексов.

Ключевые слова: витрификация, ооцит-кумулясный комплекс, фрагменты яичников, кумулюсные клетки, диметилглицеролат кремния (ДМГК), *Sus Scrofa Domesticus*.

Для цитирования: Станиславович Т. И., Кузьмина Т. И. Модификация этапов технологии интраовариальной витрификации ооцитов *Sus Scrofa Domesticus* // Аграрный вестник Урала. 2020. № 08 (199). С. 51–57. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-199-8-51-57.

Дата поступления статьи: 14.05.2020.

Постановка проблемы (Introduction)

Используемые в настоящее время способы замораживания (медленное замораживание, витрификация) и хранения живых биологических объектов в криобанках, обеспечивают сохранность генетического материала сельскохозяйственных животных в течение длительного времени с возможностью восстановления их биологических функций после оттаивания [1, с. 564], [2, с. 861]. В криохранилищах с помощью методов глубокого заморажива-

ния в жидком азоте коллекционируется ценный биоматериал, обеспечивая безопасное хранение с минимальным риском потерь в будущем [3, с. 283]. Криоконсервация создает возможность проведения научных исследований в области фундаментальных основ репродуктивной технологии, способствует генетическому мониторингу редких популяций животных, обеспечивая систематизацию информационных данных [4, с. 56–57]. По сравнению с традиционными методами криоконсервации витрифи-

кация более эффективна, проста, менее затратна по времени, не использует сложных дорогостоящих устройств. Процесс витрификации обеспечивает переход жидкости в твердое состояние без кристаллизации с увеличением вязкости в момент охлаждения. В сравнении с медленным замораживанием преимуществом витрификации является практически неограниченный срок хранения половых клеток без снижения их жизнеспособности [5, с. 160]. Однако, несмотря на многочисленные разработки криобиологов, эффективных протоколов криоконсервации ооцитов большинства видов сельскохозяйственных животных до сих пор не существует [6, с. 613]. Успех витрификации во многом обусловлен подбором оптимальных составов криопротекторных растворов. Высокие концентрации криопротекторов в растворах имеют токсичный эффект, что приводит к повреждению ооцита. Комбинации криопротекторов в одном буферном солевом растворе (высококонцентрированных проникающих криопротекторов и непроницающих криопротекторов) вызывают эффект синергизма и защищают замораживаемые объекты от повреждений с минимальной токсичностью, чем эти компоненты по отдельности [7, с. 577], [8, с. 2–3.]. Биологически активные материалы, имеющие в своем составе кремний, в последние годы все чаще используются в фармакологии и клинической практике [9, с. 74], [10, с. 22]. Одним из таких представителей является диметилглицеролат кремния $(\text{CH}_3)_2\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_2 \cdot \text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$, синтезированный в Институте

органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН. Диметилглицеролаты кремния (ДМГК) характеризуются антимикробным, ранозаживляющим и противовоспалительным действиями [11, с. 92]. Криоконсервация фрагментов яйцников становится достойной альтернативой криоконсервации ооцитов [12, с. 67], [13, с. 1240]. Данный метод позволяет сохранять примордиальные фолликулы, которые более устойчивы к дегенерации, спровоцированной воздействием сверхнизких температур, чем антральные фолликулы [14, с. 613]. Цель настоящего исследования – оценить перспективные потенциалы ДМГК как криопротекторного агента в технологии интраовариальной витрификации ооцит-кумулусных комплексов свиней.

Методология и методы исследования (Methods)

В лабораторию для эксперимента доставляли яйцники свиней породы ландрас с убойного пункта. Объектом исследования служили ооцит-кумулусные комплексы, полученные путем резекции овариальных фолликулов девитрифицированных фрагментов. Схема витрификации и выбор временных параметров обработки ФЯ свиней (экспозиция в растворах криопротекторных агентов (КПА) 25 мин. и 15 мин. последовательно), а также концентрация диметилглицеролата кремния и время выдержки в растворе определялась протоколами, разработанными нами ранее [15, с. 66, 68]. Опытная группа ФЯ свиней (15×20 мм) инкубировалась в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержащем 0,2 % ДМГК, в течение 10 мин. Для заморозки

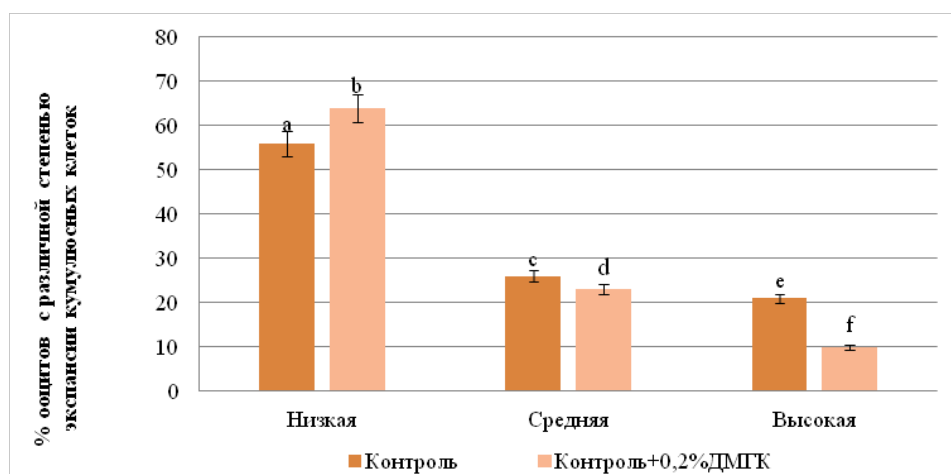


Рис. 1. Оценка морфологии кумулюса ооцитов свиней после интраовариальной витрификации (n ооцитов – 239; 3 повторности). Достоверность различий χ^2 -test: $^{ab};^{cd} P < 0,05$, $^{ef} P < 0,001$

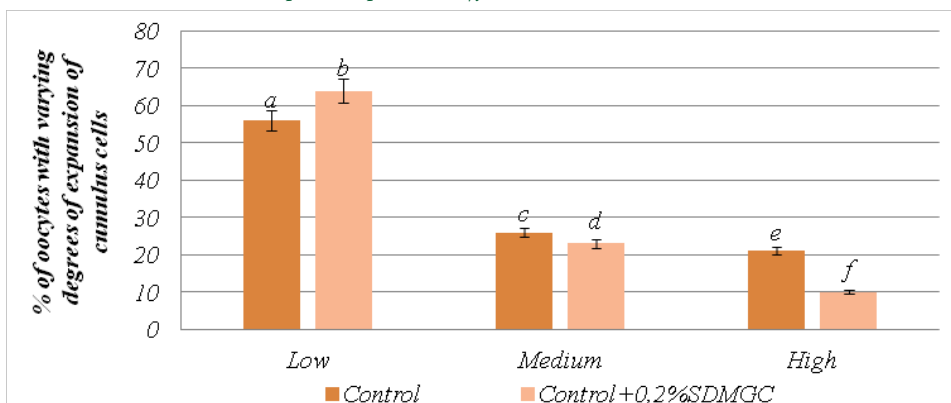


Fig. 1. Assessment of the cumulus morphology of porcine oocytes after intraovarian vitrification (n of oocytes – 239; 3 replicates). Significance of differences χ^2 -test: $^{ab};^{cd} P < 0.05$, $^{ef} P < 0.001$

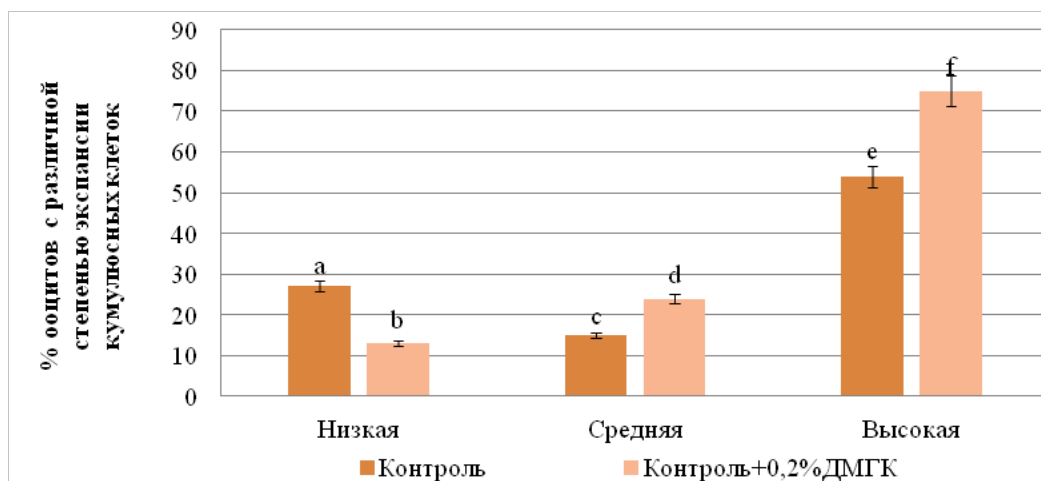


Рис. 2. Оценка морфологии кумулюса девитрифицированных ооцитов свиней после 44 часов культивирования (n ооцитов – 227; 3 повторности). Достоверность различий χ^2 -test: ^{a,b} $P < 0,001$, ^{c,d}; ^{e,f} $P < 0,05$

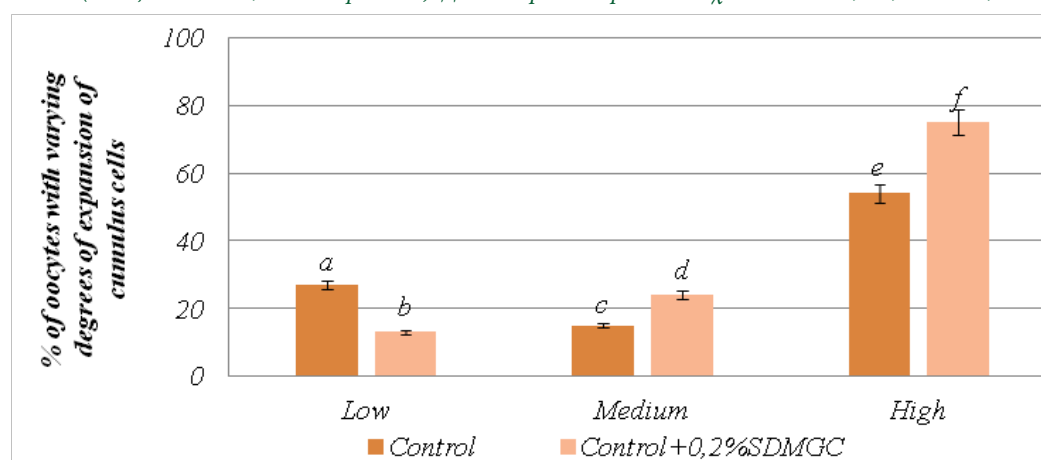


Fig. 2. Assessment of the cumulus morphology of devitrified porcine oocytes after 44 hours of cultivation (n of oocytes – 227; 3 replicates). Significance of differences χ^2 -test: ^{a,b} $P < 0.001$, ^{c,d}; ^{e,f} $P < 0.05$

ФЯ последовательно погружали в растворы, содержащие КПА (1 – 7,5 % этиленгликоль (ЭГ), 7,5 % диметилсульфоксид (ДМСО), 65 % фосфатно-солевой буфер (ФСБ), 20 % фетальная бычья сыворотка (ФБС); 2 – 20 % ЭГ, 20 % ДМСО, 60 % ФСБ, 0,5 моль/л сахарозы) в течение 25 и 15 мин. Заморозка контрольных и опытных групп ФЯ в жидком азоте происходила 24 часа. Витрифицированные образцы обеих групп оттаивали поочередно сначала в течение 1 мин. в растворе, состоящем из 80 % ФСБ, 20 % ФБС, 0,5 моль/л сахарозы, а затем 5 мин. в растворе из 80 % ФСБ, 0,25 моль/л сахарозы. После оттаивания производился отбор ооцит-кумулюсных комплексов для культивирования в соответствии с общепринятыми морфологическими критериям. Отобранные ооцит-кумулюсные комплексы свиней контрольной группы культивировали при температуре 38,5 °C, в атмосфере, содержащей 5 % CO₂, в течение 44 часов в среде Sage Media Cleavage (SMC, Coopersurgical, США) с 5 % Serum Protein Substitut (SPS, Coopersurgical, США) и 10 М.Е. хорионического гонадотропина человека (Россия, Московский эндокринный завод). Опытные группы ооцитов культивировались в контрольной среде с добавлением 0,2 % ДМГК. Оценку степени экспансии кумулюса девитрифицированных ооцит-кумулюсных комплексов проводили на микроскопе МБС-9 при увеличении 2×14. Для анализа ядерного материала ооцит-кумулюсные комплексы очищались от

клеток кумулюса и окрашивались в растворе фосфатного буфера и глицерина с добавлением 25 мг флуоресцентного красителя Hoechst 33258. Цитологическая оценка хроматина ооцитов проводилась с помощью микроскопа Carl Zeiss AxioImager A 2 m. В экспериментах использовали реагенты производства фирмы Sigma-Aldrich, за исключением указанных. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$), используя критерий χ^2 (статистическая программа Sigma Stat).

Результаты (Results)

После процедуры интраовариальной витрификации отмечено значительное число денудированных ооцитов (без кумулюса) в обеих исследуемых группах, считающихся непригодными для последующего созревания (54 % в контрольной группе против 48 % в опытной группе). Ооцит-кумулюсные взаимодействия – важный фактор приобретения ооцитами компетентности к формированию яйцеклетки и дальнейшему оплодотворению. Если до культивирования маркером высокого качества ооцита является наличие нескольких слоев (5–6) компактного кумулюса, окружающего ооцит, то процесс созревания ооцита сопровождается активной пролиферацией кумулюсных клеток с их дальнейшей дифференцировкой и активной продукцией биологически активных веществ, необходимых для завершения мейотического созревания ооцита [16, с. 1, 4].

В наших исследованиях показано, что введение в состав криопротекторных сред 0,2 % ДМГК оказало положительное влияние на сохранность клеток кумулюса после девитрификации. Доля клеток с компактным кумулюсом после процедуры оттаивания при этом возрастает до 64 % по сравнению с контролем 56 % ($P < 0,05$), а уровень ооцитов с высокоэкспандированным кумулюсом значительно снижен (10 % в опытной группе против 21 % в контроле ($P < 0,05$)) (рис. 1).

Известно, что одним из признаков созревания женской гамет является активная экспансия клеток кумулюса. В наших исследованиях введение в состав среды для культивирования ДМГК обеспечило значительный рост доли девитрифицированных ооцитов с высокоэкспандированным кумулюсом по завершении культивирования (75 % в опытной против 54 % в контрольной группе ($P < 0,05$)) (рис. 2).

Проведенная нами оценка статуса хроматина ооцитов после 44 культивирования показала, что обработка ФЯ свиней 0,2 % ДМГК перед замораживанием, а также введение его в состав культуральных сред снижали уровень дегенерированных клеток (14 % в опытной против 20 % в контрольной группе ($P < 0,05$)), а также способствовали

достижению ооцитами стадии метафаза II (64 % в опытной против 41 % в контрольной группе ($P < 0,05$)), (рис. 3).

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Инкубирование фрагментов яйчников свиней перед витрификацией в растворах, содержащих ДМГК в концентрации 0,2 %, привело к увеличению доли клеток с компактным кумулюсом после оттаивания. Культивирование девитрифицированных ооцитов свиней в течение 44 часов с диметилглицеролатом кремния обеспечило повышение доли девитрифицированных ооцитов с высокоэкспандированным кумулюсом и улучшению показателей ядерного созревания. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о целесообразности использования ДМГК в концентрации 0,2 % в качестве криопротекторного агента в технологии витрификации женских гамет, а также его введения в состав сред для культивирования ооцитов *Sus Scrofa Domesticus*.

Благодарности (Acknowledgements)

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

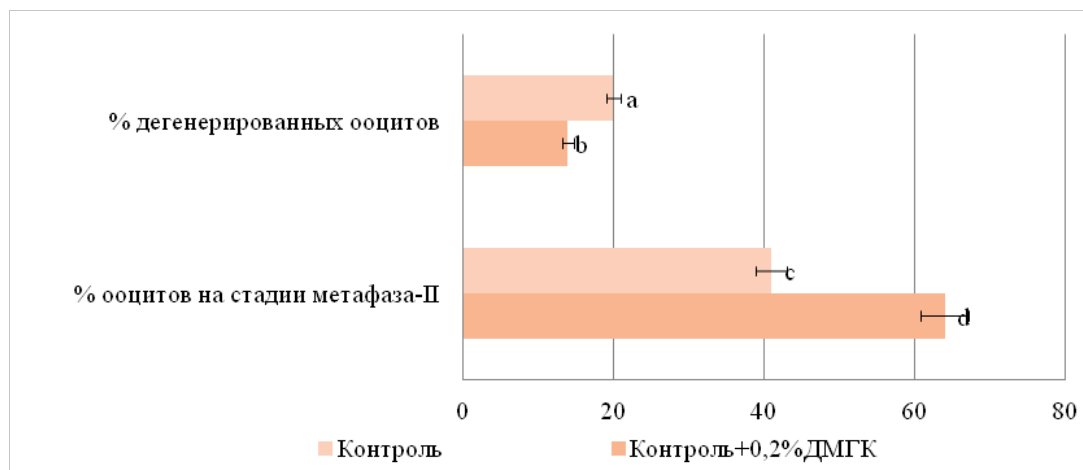


Рис. 3. Статус хроматина девитрифицированных ооцитов свиней после 44 часов культивирования (n ооцитов – 213; 3 повторности). Достоверность различий χ^2 -test: a,b,c,d $P < 0,05$

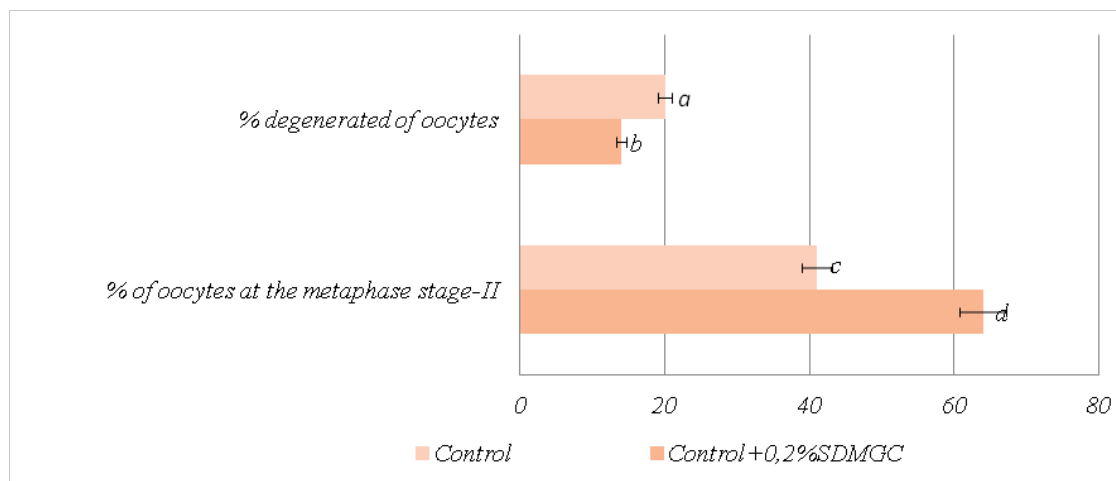


Fig. 3. Chromatin status of devitrified porcine oocytes after 44 hours of cultivation (n of oocytes – 213; 3 replicates). Significance of differences χ^2 -test: a,b,c,d $P < 0.05$

Библиографический список

1. Амстиславский С. Я., Мокроусова В. И., Кожевникова В. В., Кизилова Е. А., Брусенцев Е. Ю. Криобанк генетических ресурсов кошачьих // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 5. С. 561–568. DOI: 10.18699/VJ17.270.
2. Гахова Э. Н., Утешев В. К., Шишова Н. В., Ивлиева Н. А., Каурова С. А., Крамарова Л. И., Мельникова Е. В. Роль генетических криобанков в сохранении редких и исчезающих видов // Вестник Тамбовского университета. 2017. Т. 22. № 5. С. 861–865. DOI: 10.20310/1810-0198-2017-22-5-861-865.
3. Иолчиев Б. С., Абилов А. И., Таджиева А. В., Багиров В. А. Биологическая полноценность эпидидимального семени зубра (*Bison bonasus* L.) при криоконсервации и длительном хранении // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 2. С. 282–290. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.2.282rus.
4. Айбазов М. М., Мамонтова Т. В. Создание биоресурсных коллекций – необходимое условие сохранения и рационального использования генетических ресурсов животных // Сельскохозяйственный журнал. 2018. № 2 (11). С. 54–62. DOI: 10.25930/47pm-n875.
5. Кузьмина Т. И., Шейко И. П., Ганджа А. И., Стефанова В. Н. Витрификация ооцитов как способ сохранения генофонда животных // Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы: материалы II Международной научной конференции, посвященной 50-летию основания Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Минск, 2015. С. 160–172.
6. Абакушина Е. В., Гельм Ю. В., Миценок А. С. Флуоресцентный микроскопический анализ жизнеспособности ооцитов млекопитающих после витрификации // Оптика и спектроскопия. 2019. Т. 126. Вып. 5. С. 611–613. DOI: 10.21883/OS.2019.05.47660.9-19.
7. Somfai T., et al. Optimization of cryoprotectant treatment for the vitrification of immature cumulus-enclosed porcine oocytes: comparison of sugars, combinations of permeating cryoprotectants and equilibration regimens // Journal Reproduction and Development. 2015. Vol. 18. No. 61 (6). Pp. 571–579.
8. Kamoshita M., et al. Successful vitrification of pronuclear-stage pig embryos with a novel cryoprotective agent, carboxylated poly-L-lysine // Public Library of Science (PLOS). 2017. Pp. 1–12. DOI: 10.1371/journal.pone.0176711.
9. Бурнатов Е. Н., Щипачева О. В., Тузанкина И. А., Хонина Т. Г., Рябухин И. В., Григорьева Ю. В., Мальчиков А. И. Сравнительный эффект кремнийцинка содержащего глицерогидрогеля и тестируемых иммуотропных препаратов на модели гриппозной инфекции у мышей // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2016. № 31. С. 73–76.
10. Kuzmina T. I., Stanislavovich T. I., Kravtsov V. Yu. Cytoprotective effect of highly dispersed silica nanoparticles on the viability of granulosa from porcine follicles // Russian Journal of Developmental Biology. 2018. Vol. 49. No. 4S. Pp. 22–23.
11. Саркисян Н. Г., Ронь Г. И., Тузанкина И. А., Хонина Т. Г., Ларионов Л. П., Симбирцев А. С., Дроздова Л. И., Тимченко А. С. Морфологическая оценка эффективности использования фармакологических композиций на основе кремнийорганического глицерогидрогеля // Иммунология. 2017. Т. 38. № 2. С. 91–96. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-2-91-96>.
12. Sanfilippo S., Canis M., Smits J., et al. Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing // Reproductive Biology and Endocrinology. 2015. No. 13. Pp. 67. DOI:10.1186/s12958-015-0065-5.
13. Mouttham L., et al. Damage to fetal bovine ovarian tissue caused by cryoprotectant exposure and vitrification is mitigated during tissue culture // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2015. Vol. 32. No. 8. Pp. 1239–1250.
14. Suzuki N., Yoshioka N., Takae S., Sugishita Y., Tamura M., Hashimoto S., et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency // Human Reproduction. 2015. Vol. 30. No. 3. Pp. 608–615. DOI:10.1093/humrep/deu353.
15. Станиславович Т. И., Кузьмина Т. И., Молчанов А. В. Влияние интраовариальной витрификации на показатели криорезистентности ооцит-кумулюсных комплексов свиней // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2019. № 4. С. 65–70. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2019.4.
16. Macaulay D. Angus, et al. Cumulus cell transcripts transit to the bovine oocyte in preparation for maturation // Biology of reproduction. 2016. Vol. 94. No. 1 (16). Pp. 1–11.

Об авторах:

Татьяна Ивановна Станиславович¹, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологии развития, ORCID 0000-0003-2157-070X, AuthorID 838525; +7 921 402-67-19, lllfor@mail.ru

Татьяна Ивановна Кузьмина¹, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией биологии развития, ORCID 0000-0002-2246-5277, AuthorID 78163; +7 921 392-19-47

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального научного центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста (ВНИИГРЖ), Пушкин, Россия

Modification of the stages of the technology of intraovarian vitrification of oocytes *Sus Scrofa Domesticus*

T. I. Stanislavovich¹, T. I. Kuzmina¹

¹ All-Russian Scientific Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – Branch of the Federal Scientific Center for Animal Husbandry – All-Russian Scientific Research Institute of Animal Husbandry named after Academician L. K. Ernst, Pushkin, Russia

E-mail: lllfor@mail.ru

Abstract. Intraovarian vitrification of oocytes of farm animals today is a very promising direction. The composition of cryoprotective solutions requires further improvement. Vitrification of ovarian fragments (FO) allows to save primordial follicles, a structure that is more stable, due to the lack of follicular fluid, to destructive processes provoked by ultra-low temperatures. The high reproductive potential of pigs is due to their physiological characteristics of growth and development. Silicon is a minor trace element in its content; it is increasingly used in pharmacology, veterinary medicine, and clinical practice. Nitrogen silicon dimethylglycerolate (SDMGC) are antimicrobial, wound healing and anti-inflammatory in nature. The presence of a compact cumulus surrounding the oocyte is one of the important indicators of the reliability of the female gamete for extrafollicular maturation. **Purpose of this study:** to was to evaluate the effect of introducing 0.2 % silicon dimethylglycerolate into cryoprotective solutions during intraovarian vitrification and the medium for maturation of devitrified oocyte-cumulus complexes of pigs on the morphology of cumulus cells and the state of nuclear material. Ovarian fragments of pigs (15 × 20 mm) to vitrification are exposed prior for 25 minutes and 15 minutes direct in cryoprotective solutions of the following composition: CPA 1 – 7.5 % ethylene glycol (EG), 7.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO), 65 % phosphate-buffered saline (PBS), 20 % fetal bovine serum (FBS); CPA 2 – 20 % EG, 20 % DMSO, 60 % FBS, 0.5 mol/L sucrose. The experimental group was treated for 10 minutes in a solution of phosphate-saline buffer with 0.2 % SDMGC. Hoechst 33258 was used to evaluate chromatin status, samples were analyzed using a ZEISS Axio Imager A 2 m microscope. **The result.** Incubation of ovarian fragments of pigs in a solution containing 0.2 % SDMGC before vitrification, as well as the introduction of 0.2 % SDMGC in the composition of oocyte maturation media, had a positive effect on the morphology of cumulus cells (degree of expansion) after the thawing procedure. The proportion of compact cumulus devitrified cells pretreated with 0.2 % SDMGC increased compared with the control group (64 % vs 56 %, $P < 0.05$ (χ^2 -test)). The level of oocytes with cumulus is in a high degree of expansion after 44 hours of cultivation with 0.2 % SDMGC in the experimental group was 75 % vs 54 % in the control group, $P < 0.05$ (χ^2 -test). The use of SDMGC in the cultivation of devitrified oocyte-cumulus complexes of pigs for 44 hours increased the proportion of matured oocytes from 41 % in the control group to 64 % in the experimental group $P < 0.05$ (χ^2 -test). **The scientific novelty:** the stages of the technology of intraovarian vitrification of porcine oocytes by means of preventive incubation of ovarian fragments in a solution of 0.2 % SDMGC and its introduction into the medium for culturing oocyte-cumulus complexes were modernized.

Keywords: vitrification, oocyte-cumulus complex, ovarian fragments, cumulus cells, silicon dimethylglycerolate (SDMGC), *Sus Scrofa Domesticus*.

For citation: Stanislavovich T. I., Kuzmina T. I. Modifikatsiya etapov tekhnologii intraovarial'noy vitrifikatsii ootsitov *Sus Scrofa Domesticus* [Modification of the stages of the technology of intraovarian vitrification of oocytes *Sus Scrofa Domesticus*] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2020. No. 08 (199). Pp. 51–57. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-199-8-51-57. (In Russian.)

Paper submitted: 14.05.2020.

References

1. Amstislavskiy S. Ya., Mokrousova V. I., Kozhevnikova V. V., Kizilova E. A., Brusentsev E. Yu. Kriobank geneticheskikh resursov koshach'ikh [Genome resource banking in the family Felidae] // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017. Vol. 21. No. 5. Pp. 561–568. DOI: 10.18699/VJ17.270. (In Russian.)
2. Gakhova E. N., Uteshev V. K., Shishova N. V., Ivlicheva N. A., Kaurova S. A., Kramarova L. I., Mel'nikova E. V. Rol' geneticheskikh kriobankov v sokhraneni redkikh i ischezayushchikh vidov [The role of genetic cryobanks in the conservation of rare and endangered animals] // Tambov University Review. Series: Humanities. 2017. Vol. 22. No. 5. Pp. 861–865. DOI: 10.20310/1810-0198-2017-22-5-861-865. (In Russian.)
3. Iolchiev B. S., Abilov A. I., Tadzhieva A. V., Bagirov V. A. Biologicheskaya polnotsennost' epididimal'nogo semeni zubra (*Bison bonasus* L.) pri kriokonservatsii i dlitel'nom khraneni [Biological integrity of bison epididymal sperm under cryo-conservation and long storage] // Sel'skokhozyaystvennaya biologiya. 2017. Vol. 52. No. 2. Pp. 282–290. DOI: 10.15389/agrobiologiya.2017.2.282rus. (In Russian.)
4. Aybazov M. M., Mamontova T. V. Sozдание bioresursnykh kollektsey – neobkhodimoe uslovie sokhraneniya i ratsional'nogo ispol'zovaniya geneticheskikh resursov zhivotnykh [The creation of bio-resource collections is the necessary condition for conservation and rational use of animal genetic resources] // Sel'skokhozyaystvennaya biologiya. 2018. No. 2 (11). Pp. 54–62. DOI: 10.25930/47pm-n875. (In Russian.)

5. Kuz'mina T. I., Sheyko I. P., Gandzha A. I., Stefanova V. N. Vitriifikatsiya ootsitov kak sposob sokhraneniya genofonda zhivotnykh [Vitrification of oocytes as a method to preserve animal gene pool] // *Genetika i biotekhnologiya XXI veka: problemy, dostizheniya, perspektivy: materialy II Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii, posvyashchennoy 50-letiyu osnovaniya Instituta genetiki i tsitologii NAN Belarusi*. Minsk, 2015. Pp. 160. (In Russian.)
6. Abakushina E. V., Gel'm Yu. V., Mitsenik A. S. Fluorescentnyy mikroskopicheskiy analiz zhiznesposobnosti ootsitov mlekoпитayushchikh posle vitriifikatsii [Fluorescent Microscopy Analysis of Mammalian Oocyte Viability after Vitrification] // *Optika i spektroskopiya*. 2019. Vol. 126. No. 5. Pp. 611–613. DOI: 10.21883/OS.2019.05.47660.9-19. (In Russian.)
7. Somfai T., et al. Optimization of cryoprotectant treatment for the vitrification of immature cumulus-enclosed porcine oocytes: comparison of sugars, combinations of permeating cryoprotectants and equilibration regimens // *Journal Reproduction and Development*. 2015. Vol. 18. No. 61 (6). Pp. 571–579.
8. Kamoshita M., et al. Successful vitrification of pronuclear-stage pig embryos with a novel cryoprotective agent, carboxylatedε-poly-L-lysine // *Public Library of Science (PLOS)*. 2017. Pp. 1–12. DOI: 10.1371/journal.pone.0176711.
9. Burnatova E. N., Shchipacheva O. V., Tuzankina I. A., Khonina T. G., Ryabukhin I. V., Grigor'eva Yu. V., Mal'chikov A. I. Sravnitel'nyy effect kremniysink soderzhashchego glitserogidrogelya i testiruemykh immunotropnykh preparatov na modeli grippoznoy infektsii u myshey [Comparative antiviral effect of organico siliconz incg lycerohydrogel and immunotropic drugs under test on murine influenza model] // *Dal'nevostochnyy Zhurnal Infektsionnoy Patologii*. 2016. No. 31. Pp. 73–76. (In Russian.)
10. Kuzmina T. I., Stanislavovich T. I., Kravtsov V. Yu. Cytoprotective effect of highly dispersed silica nanoparticles on the viability of granulosa from porcine follicles // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2018. Vol. 49. No. 4S. Pp. 22–23.
11. Sarkisyan N. G., Ron' G. I., Tuzankina I. A., Khonina T. G., Larionov L. P., Simbirtsev A. S., Drozdova L. I., Timchenko A. S. Morfologicheskaya otsenka effektivnosti ispol'zovaniya farmakologicheskikh kompozitsiy na osnove kremniy-organicheskogo glitserogidrogelya [Morphological evaluation of the effectiveness of the use of pharmaceutical compositions based on silicone glycerokinase] // *Immunologiya*. 2017. Vol. 38. No. 2. Pp. 91–96. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-2-91-96>. (In Russian.)
12. Sanfilippo S., Canis M., Smits J., et al. Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing // *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2015. No. 13. Pp. 67. DOI:10.1186/s12958-015-0065-5.
13. Mouttham L., et al. Damage to fetal bovine ovarian tissue caused by cryoprotectant exposure and vitrification is mitigated during tissue culture // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2015. Vol. 32. No. 8. Pp. 1239–1250.
14. Suzuki N., Yoshioka N., Takae S., Sugishita Y., Tamura M., Hashimoto S., et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency // *Human Reproduction*. 2015. Vol. 30. No. 3. Pp. 608–615. DOI: 10.1093/humrep/deu353.
15. Stanislavovich T. I., Kuz'mina T. I., Molchanov A. V. Vliyanie intraovarial'noy vitriifikatsii na pokazateli kriorezistentnosti ootsit-kumulyusnykh kompleksov sviney [Effect of intraovarian vitrification on the indicators of cryoresistance in porcine cumulus-oocyte complexes] // *Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii*. 2019. No. 4. Pp. 65–70. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2019.4. (In Russian.)
16. Macaulay D. Angus, et al. Cumulus cell transcripts transit to the bovine oocyte in preparation for maturation // *Biology of reproduction*. 2016. Vol. 94. No. 1 (16). Pp. 1–11.

Authors' information:

Tatiana I. Stanislavovich¹, candidate of agricultural sciences, leading researcher of the laboratory of developmental biology, ORCID 0000-0003-2157-070X, AuthorID 838525: +7 921 402-67-19, lllfor@mail.ru

Tatiana I. Kuzmina¹, doctor of biological sciences, professor, chief researcher, head of the laboratory of developmental biology, ORCID 0000-0002-2246-5277, AuthorID 78163: +7 921 392-19-47

¹ All-Russian Scientific Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – Branch of the Federal Scientific Center for Animal Husbandry – All-Russian Scientific Research Institute of Animal Husbandry named after Academician L. K. Ernst, Pushkin, Russia