



## АКУШЕРСТВО, ГИНЕКОЛОГИЯ

УДК: 636.234.1:636.034:636.2.034

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.1.318

### ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТА ЭСТРАЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ КОРОВ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ В СРЕДУ ДЛЯ ДОЗРЕВАНИЯ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ *IN VITRO*

Шульгин И.К.\* – асп. кафедры генетики, разведения и биотехнологии животных (ORCID 0000-0002-7652-966X); Ротарь Л.Н. – канд. биол. наук, доц. кафедры генетики, разведения и биотехнологии животных (ORCID 0000-0001-8151-7164); Шульгина В.Д. – асп. кафедры генетики, разведения и биотехнологии животных (ORCID 0000-0001-9538-493X).

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет»

\*ilya.shulgin@mail.ru

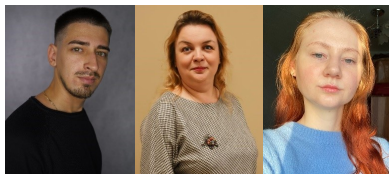
**Ключевые слова:** *in vitro*, крупный рогатый скот, ооцит-кумулюсный комплекс, созревание ооцитов, эстральная сыворотка крови.

**Key words:** *in vitro*, cattle, oocyte-cumulus complex, oocyte maturation, oestral blood serum.

Поступила: 01.12.2023

Принята к публикации: 25.03.2024

Опубликована онлайн: 02.04.2024



#### РЕФЕРАТ

Получение эмбрионов сельскохозяйственных животных *in vitro* – это один из методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), который может применяться как прижизненно, так и постмортально. Цель и задачи: провести исследование эффекта эстральной сыворотки крупного рогатого скота на мейотическое созревание ооцита крупного рогатого скота (КРС) и ранний эмбриогенез до развития бластоцист, при добавлении в среду для дозревания ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК). Было проведено слепое рандомизированное контролируемое исследование по влиянию эстральной сыворотки крупного рогатого скота на развитие бластоцист при добавлении в среду для дозревания ОКК. Эстральную сыворотку получали из крови клинически здоровых коров с ярко выраженными признаками стадии возбуждения полового цикла. Исследование проводилось в условиях промышленного животноводства при реализации коммерческого проекта в Вологодской и Рязанской областях. Материалом для исследования являлись ооцит-кумулюсные комплексы, полученные методом прижизненной аспирации от 89 коров голштинской породы с молочной продуктивностью более 10 тыс. кг. за лактацию. Ооцит - кумулюсные комплексы были разделены на 2 группы: 1 группа (контроль) – дозревание ооцитов проводилось в коммерческой среде IVM (производство Китай) без добавления эстральной сыворотки, 2 группа (опыт) – дозревание ооцитов проводилось в коммерческой IVM среде с добавлением эстральной

сыворотки в концентрации от 5 до 15%. Содержащиеся в эстральной сыворотке гормоны, ростовые факторы и биологически активные вещества не оказывают эффекта на достижение ОКК стадии метафазы II мейоза, а также на этапе дроблений, более того, прослеживается негативный эффект на этих стадиях развития. Однако содержащиеся в эстральной сыворотке вещества способны аккумулироваться в ОКК на стадии созревания до метафазы II мейоза, при этом усиливая потенциал ооцитов к эмбриональному развитию и в дальнейшем положительно влияя на достижение ими стадии бластоцисты. Разница в образовании бластоцист от дробящихся эмбрионов достигает более 25%, а разница в образовании бластоцист от жизнеспособных ОКК, созреваемых в средах без добавления сыворотки и модифицированных эстральной сывороткой составляет 37,5% в пользу последних.

### ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Сохранение и преумножение существующего поголовья скота является важной стратегической задачей, которая обеспечивает продовольственную безопасность страны и нивелирует зависимость от импорта генетически ценных высокопродуктивных животных. Получение эмбрионов сельскохозяйственных животных *in vitro* – это один из методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), который может применяться как прижизненно, так и постмортально. Благодаря технологии получения эмбрионов появляется возможность преумножать потомство от высокоценных в хозяйстве коров, чьих телят будут вынашивать менее ценные особи [1,2].

Метод получения эмбрионов *in vitro* включает: прижизненное или постмортальное извлечение из овариальных фолликулов ооцит – кумулюсных комплексов методикой фолликулярной аспирации или овариальной резекции, их последующее созревание до стадии метафазы II мейоза, оплодотворение *in vitro* и дальнейшее культивирование эмбрионов до стадии бластоцисты. Данный метод позволяет в короткие сроки оптимизировать селекционную работу с поголовьем за счёт большого количества потомков, полученных от высокопродуктивных особей [3].

Экстракорпоральное созревание ооцитов (*in vitro maturation*, IVМ) — первый эмбриологический этап получения эмбрионов *in vitro* (*in vitro embryo production*, IVP). Исходная популяция ооцит-кумулясных комплексов гетерогенна, поэтому состав среды для созревания, состав газовой смеси, которые окружают

ооциты вне организма, критически влияют на их качество и успех всех проведённых манипуляций, что делает данное направление объектом большого количества исследований и дискуссий [4-6].

Цель и задачи данного исследования: провести исследование эффекта эстральной сыворотки крупного рогатого скота на мейотическое созревание ооцита и ранний эмбриогенез до развития бластоцист, при добавлении в среду для созревания ооцит-кумулясных комплексов (ОКК).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Было проведено слепое рандомизированное контролируемое исследование по влиянию эстральной сыворотки крупного рогатого скота на развитие бластоцист при добавлении в среду для созревания ОКК. Эстральную сыворотку крови получали из крови клинически здоровых коров с ярко выраженными признаками стадии возбуждения эстрального цикла. Из яремной вены было получено 200 мл крови в стерильные пробирки объемом 50 мл. без добавления коагулянта. Далее пробирки с кровью отстаивались при комнатной температуре 20 часов до образования сгустка и отделения сыворотки. Сыворотку помещали в стерильные пробирки 10 мл и центрифугировали в течение 15 мин при 300G. После центрифугирования супернатант отбирали в стерильные пробирки 10 мл и инактивировали на водяной бане при температуре +56<sup>0</sup>С в течение 30 мин. Затем сыворотка двукратно пропусклась через фильтр с диаметром пор 22μм, и готовили аликвоты в стерильные пробирки по 1 мл, которые храни-

лись при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Перед добавлением сывотки в среду культивирования ее дефростировали при комнатной температуре.

Исследование проводилось в условиях промышленного животноводства, в ходе реализации коммерческих пилотных проектов. Материалом для исследования являлись ооцит-кумуляусные комплексы, которые были получены методом прижизненной аспирации от 89 коров голштинской породы с молочной продуктивностью более 10 тыс. кг. за лактацию.

Прижизненную пункцию фолликулов выполняли с применением сакральной эпидуральной анестезии, с использованием OPU-системы (Бразилия) для крупного рогатого скота, ультразвукового сканера CHESON (Китай), адаптера для микроконвексного датчика (Россия), вакуумной помпы для аспирации (Бразилия). Аспирацию фолликулов проводили иглой диаметром 18G и длиной 55 мм. В качестве аспирационной жидкости использовали среду Дюльбеко с добавлением гепарина 400 МЕ, гентамицина 0,2 мл, BSA 1г, на 400,0 мл среды (Россия).

Полученные ОКК оценивали морфологически визуальным методом на пригодность к дальнейшему созреванию, денудированные ооциты (без слоя кумулюсных клеток) и ОКК с признаками дегенерации в работу не брали. Ооцит - кумулюсные комплексы были разделены на 2 группы: 1 группа (контроль,  $n=219$  ОКК) – дозревание ооцитов проводилось в коммерческой среде IVM (Китай) без добавления эстральной сыворотки, ОКК, 2 группа (опыт,  $n=119$  ОКК) – дозревание ооцитов проводилось в коммерческой IVM среде (Китай) с добавлением эстральной сыворотки. ОКК культивировали *in vitro* группами в каплях, под минеральным маслом, в течение 24 часов в среде для дозревания ооцитов с добавлением эстральной сыворотки коров голштинской породы в концентрации от 5 до 15%. Все этапы культивирования проводились в планшетном инкубаторе (производство Бразилия) в увлажненной газовой среде, при температуре  $38,5^{\circ}\text{C}$ , состав мультигазовой смеси  $5\%\text{O}_2$ ,  $5\%$

$\text{CO}_2$ ,  $90\%\text{N}_2$ . Далее ооциты оплодотворяли *in vitro*, размороженным на водяной бане при  $36^{\circ}\text{C}$  30 сек. сексированным семенем быков, обработанным в градиенте Percoll 90% и 45%. После оплодотворения, через 24 часа, проводили денудацию зигот, после чего осуществляли визуальную оценку дробления и раннего развития эмбрионов на 3 и 5 сутки культивирования *in vitro*. На 7-8 сутки образовавшиеся бластоцисты витрифицировались. Все манипуляции с гаметам и эмбрионами проводились в асептических условиях с применением культурального пластика прошедшего тест на эмбриотоксичность [7,8]. Статистическую обработку полученных данных, для оценки значимости различий в группах проводили с помощью пакета анализа Microsoft Office Excel 2019 с использованием t-критерия Стьюдента.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

От 50 голов было получено 286 ОКК, из этого количества жизнеспособными и пригодными для IVM признано 219, которые дозревали в среде без добавления эстральной сыворотки коров (1 группа), и от 39 голов - 162 ОКК, жизнеспособными и пригодными для IVM признано 119, которые дозревали в среде с добавлением 10% эстральной сыворотки коров (2 группа). Во время аспирации в среднем на голову было получено 5,72 ОКК от первой группы коров и 4,15 ОКК от второй группы коров. Сразу после аспирации жизнеспособными и пригодными к дальнейшим этапам были признаны 219 ОКК в первой группе и 119 ОКК во второй группе. Результаты представлены в таблице 1.

Следующим важным шагом было дозревание ОКК до стадии метафазы II мейоза, в первой группе дозрели 74 ОКК, что составляет 33,8% от жизнеспособных ОКК, во второй группе 15 ОКК, что составляет 31,1% от жизнеспособных ОКК. Из них начали дробиться 46 зигот в первой группе (62,2%) и 15 зигот во второй группе (40,5%), наблюдаемые различия в исследуемых группах статистически значимы (уровень значимости t-критерия Стьюдента  $p<0,05$ ). Из дробящихся эм-

брионов первой группы дозрели до стадии бластоцисты 15, что составляет 15,2% от общего числа дроблений, во второй группе – 9, что статистически достоверно (уровень значимости  $p < 0,05$ ). Составляет 60% от общего числа дроблений.

Также было проведено сравнение влияния различной концентрации эстральной сыворотки коров на дозревание ОКК до стадии метафазы II. Оценивалась эффективность добавления в среду для IVМ 5%, 10% и 15% эстральной сыворотки. На исходное качество ОКК, а также на количество жизнеспособных из них влияют многие причины, которые связанные с паратипическими факторами, которые ассоциированы с конкретной самкой (возраст, направление и уровень продуктивности, порода, физиологическое состояние, сбалансированность рациона, вакцинация, сезон года и др.). Однако, результат дозревания ОКК до стадии метафазы II мейоза, в том числе, зависит от состава культуральной среды, времени и условий культивирования. Жизнеспособ-

ные ооцит-кумулусные комплексы, полученные в результате аспирации, в опытной группе случайным образом были разделены на группы, которые культивировались в среде для дозревания с добавлением сыворотки в разной концентрации. Результаты сравнения влияния концентрации сыворотки на дозревание ОКК до стадии метафазы II представлены в таблице 2. Несмотря на высокий процент жизнеспособных ОКК в группе, где в среду добавляли 5% эстральной сыворотки (80,65%), результат по достижению ОКК до стадии метафазы II оказался самым низким (20%). При добавлении в среду для созревания ОКК 10% эстральной сыворотки, достижение ОКК до стадии метафазы II возрастает до 26,44%. Самый высокий выход ОКК, достигших стадии метафазы II оказался в группе, где добавляли 15% эстральной сыворотки. Полученные нами данные согласуются с результатами исследований ряда авторов, которые показывают, что добавление эстральной сыворотки в среду для созревания ОКК оказывает больший эффект по

Таблица 1 - Оогенез и ранний эмбриогенез коров

Группа	ОПУ, п голов	п, ОКК	ОКК, среднее на голову	п, ОКК жизнеспособных (% от ОКК)	ОКК жизнеспособных, среднее на голову	МII (% от ОКК жизнеспособных)	дроблений (% от МII)	бластоцист (% от дроблений)
1. Среда дозревания ОКК без сыворотки (контроль)	50	286	5,72	219 (76,5)	4,38	74 (33,8)	46 (62,2)	7 (15,2)
2. Среда дозревания ОКК сыворотка (опыт)	39	162	4,15	119 (74,3)	3,05	37 (31,1)	15 (40,5)	9 (60,0)
Всего	89	448	-	338	-	111	61	16

Таблица 2 - Сравнение влияния концентрации сыворотки на дозревание ОКК до стадии метафазы II

Концентрация сыворотки, %	п, ОКК	п, ОКК жизнеспособных	% жизнеспособных ОКК	МII	% МII (от жизнеспособных ОКК)
5	31	25	80,65	5	20,00
10	239	174	72,80	46	26,44
15	22	17	77,27	7	41,18

сравнению с фетальной. По их данным, уровень дробления увеличивается в зависимости от концентрации сыворотки на 1,2-14,9%, а бластоцист – на 1,6-6,0 %. Это говорит о возрастании эффективности эстральной сыворотки с увеличением концентрации, т.к. растет концентрация стероидных и гонадотропных гормонов, а также аминокислот, благоприятно влияющих на развитие эмбриона [9, 10]. В частности, в период половой охоты уровень эстрадиола-17  $\beta$  в крови у коров достигает до 21.42 пг/мл, [11, 12], а использование эстрадиола-17 $\beta$  во время выращивания культуры улучшает мейотическую и онтогенетическую компетентность ооцитов, способность к расширению кумулюса и прикрепление кумулюсных клеток к ооцитам [13-15].

#### ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Содержащиеся в эстральной сыворотке гормоны, ростовые факторы и биологически активные вещества не оказывают эффекта на достижение ОКК стадии метафазы II мейоза, а также на этапе дроблений, более того, прослеживается негативный эффект на этих стадиях развития. Однако содержащиеся в эстральной сыворотке гормоны, ростовые факторы и биологически активные вещества способны аккумулироваться в ОКК на стадии дозревания до метафазы II мейоза, при этом усиливая потенциал ооцитов к эмбриональному развитию и в дальнейшем положительно влияя на достижение ими стадии бластоцисты. Разница в образовании бластоцист от дробящихся эмбрионов достигает более 25%, а разница в образовании бластоцист от жизнеспособных ОКК, дозреваемых в средах без добавления сыворотки и модифицированных эстральной сывороткой составляет 37,5% в пользу последних.

#### RESEARCH OF THE EFFECT OF ESTRAL SERUM OF COWS WHILE ADDING TO THE OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES MATURATION MEDIUM *IN VITRO*

**Shulgin I.K.\*** – postgraduate student of the Department of Genetics, Breeding and Biotechnology of Animals (ORCID 0000-

0002-7652-966X); **Rotar L.N.** – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Genetics, Breeding and Biotechnology of Animals (ORCID 0000-0001-8151-7164); **Shulgina V.D.** – postgraduate student of the Department of Genetics, Breeding and Biotechnology of Animals (ORCID 0000-0001-9538-493X).

Saint-Petersburg State Agrarian University

\*ilya.shulgin@mail.ru

#### ABSTRACT

Saving and multiplying the existing livestock population is an important strategic objective that ensures the country's food security and levelling the dependence on imports of genetically valuable highly productive animals. Obtaining farm animal embryos *in vitro* is one of the methods of assisted reproductive technologies (ART), which can be used both lifetime and post-mortem. This method allows to optimise breeding work with livestock in a short period of time due to the large number of offspring obtained from highly productive individuals. Aim and objectives: to investigate the effect of bovine estrous serum on meiotic oocyte maturation and early embryogenesis prior to blastocyst development, when added to oocyte-cumulus complexes (OCC) maturation medium. A blind randomised controlled trial was conducted on the effect of bovine estral serum on blastocyst development when added to OCC maturation medium. Estral serum was obtained from the blood of clinically healthy cows with pronounced signs of puberty. The study was carried out in conditions of industrial livestock breeding. The material for the study were oocyte-cumulus complexes obtained by the method of lifetime aspiration from 89 Holstein cows with milk productivity of more than 10 thousand kg per lactation. Oocyte-cumulus complexes were divided into 2 groups: Group 1 (control) - oocyte maturation was carried out in commercial IVM medium without addition of estrous serum, Group 2 (experiment) - oocyte maturation was carried out in commercial IVM medium with addition of es-



trous serum in concentration from 5 to 15%. The hormones, growth factors and biologically active substances contained in estrous serum have no effect on the achievement of OCC at the stage of metaphase II of meiosis, as well as at the stage of fractions; moreover, a negative effect at these stages of development can be traced. However, substances contained in estrous serum are able to saturate and accumulate in OCC at the stage of maturation to metaphase II of meiosis, thus enhancing the potential of oocytes to embryonic development and further positively affect their achievement of the blastocyst stage. The difference in the formation of blastocysts from crushed embryos reaches more than 25%, and the difference in the formation of blastocysts from viable JCCs matured in media without serum and modified with estrous serum is 37.5% in favour of the latter.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- 1.Рябова Т.Ф., Минаева Е.В., Юткина О.В. Перспективы воспроизводства в животноводческой отрасли в России // Пищевая промышленность, – 2018. №8. С. 49-51.
- 2.Robert B. Gilchrist, Jeremy G. Thompson Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro // Theriogenology, – 2007, V. 67, I. 1, P. 6-15. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.027>.
- 3.Шульгин, И. К. Сравнение методик выделения ооцит-кумулюсных комплексов из яичников животных после овариоэктомии / И. К. Шульгин, Л. Н. Ротарь, В. Д. Шульгина // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. – 2023. – № 2(71). – С. 114-120. – DOI 10.24412/2078-1318-2023-2-114-120.
- 4.Михайлова Н.Д. Дозревание ооцитов in vitro / Михайлова Н.Д., Мишиева Н.Г., Кириллова А.О., Мартазанова Б.А., Джинчарадзе Л.Г. // Акушерство и гинекология – 2021, – № 11. С. 64-70. DOI 10.18565/aig.2021.11.
- 5.Ali A., Benkhalifa M., Miron P., In-vitro maturation of oocytes: biological aspects // Reproductive BioMedicine, – 2006, V. 13, I. 3, P. 437-446. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61450-2](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61450-2).
- 6.Alberto Maria L. Marc-André S. Successful in vitro maturation of oocytes: a matter of follicular differentiation // Biology of Reproduction, – 2017, V. 98, I. 2, P. 162- 169. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox149>.
- 7.Сметанина И.Г., Татарина Л.В. Влияние сыворотки крови на созревание ооцитов и развитие эмбрионов крупного рогатого скота in vitro // Проблемы биологии продуктивных животных - 2018. №3. С. 45-53.
- 8.Сингина Г.Н., Шедова Е.Н. Дозревание ооцитов коров в среде fert-talp повышает их качество и компетентность к развитию in vitro // Сельскохозяйственная биология, - 2019, т.54, № 6. С. 1206-1213.
- 9.Голубец Л.В. Эффективность использования эстральной сыворотки в культуральных системах in vitro / Голубец Л.В., Старовойтова М.П., Отрошенко А. Е. // Зоотехническая наука Беларуси, - 2009.- т.44, №1. С. 37-44.
- 10.Ахмолдаева А. М. Созревание и оплодотворение in vitro ооцитов крупного рогатого скота при действии биологически активных веществ/А. М. Ахмолдаева, Н. И. Сергеев, И. А. Порфирьев // Сельскохозяйственная биология – 2003. – № 6. С. 58-65.
- 11.Голубец Л.В., Леткевич Л.Л., Ганджа А.И., Симоненко В.П. Эффективность использования энергетических и гормональных добавок при получении эмбрионов крупного рогатого скота вне организма / Голубец Л.В., Леткевич Л.Л., Ганджа А.И., Симоненко В.П.// Зоотехническая наука Беларуси, - 2003. - том 3. – С. 27-32.
- 12.Баковецкая О. В. Закономерности и механизм функционирования репродуктивной системы коров и кобыл в период эструса и разработка метода определения оптимального времени осеменения. Докторская диссертация, 2006, Рязань.
- 13.Naoko Kubo, Ilse Silvia Cayo-Colca. Effect of estradiol-17 $\beta$  during in vitro growth culture on the growth, maturation, cumulus expansion and development of porcine oocytes from early antral follicles. Ta-

kashi Miyano Anim Sci J. – 2015. - № 86(3). P. 251-259. DOI: 10.1111/asj.12283.  
 14.Beker I, Colenbrander B, Bevers M. Effect of 17beta-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes Theriogenology 2002 Dec;58(9). P. 1663-1673  
 15.Yon Soepri Ondho, Daud Samsudewa, Dela Ayu Lestari in vitro Maturation of Ovine Oocytes Using Follicle Stimulating Hormone (FSH), Estradiol-17 $\beta$ , and Co-Culture of Fallopian Tube Epithelial Cells (FTEC) in Tissue Culture Medium-199 (TCM-199) Int J Vet Sci, 2020, 9(1). P. 66-71.

# REFERENCES

1.Ryabova Taisiya Fominichna, Minaeva Elena Vyacheslavovna, Yutkina Olga Vladimirovna Prospects for reproduction in the livestock industry in Russia // Food industry, - 2018. No. 8. pp. 49-51.  
 2.Robert B. Gilchrist, Jeremy G. Thompson Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro // Theriogenology, – 2007, V. 67, I. 1, P. 6-15. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.027>.  
 3.Shulgin, I.K. Comparison of methods for isolating oocyte-cumulus complexes from the ovaries of animals after ovariectomy / I.K. Shulgin, L.N. Rotar, V.D. Shulgina // News of the St. Petersburg State Agrarian University. – 2023. – No. 2(71). – pp. 114-120. – DOI 10.24412/2078-1318-2023-2-114-120.  
 4.Mikhailova N.D. Maturation of oocytes in vitro / Mikhailova N.D., Mishieva N.G., Kirillova A.O., Martazanova B.A., Dzhincharadze L.G. // Obstetrics and gynecology – 2021. - No. 11. P. 64-70. DOI 10.18565/aig.2021.11.  
 5.Ali A., Benkhalifa M., Miron P., In-vitro maturation of oocytes: biological aspects // Reproductive BioMedicine, – 2006, V. 13, I. 3, P. 437-446. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61450-2](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61450-2).  
 6.Alberto Maria L. Marc-André S. Successful in vitro maturation of oocytes: a matter of follicular differentiation // Biology of Reproduction, – 2017, V. 98, I. 2, P. 162- 169. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox149>.  
 7.Smetanina I.G., Tatarinova L.V. The influ-

ence of blood serum on the maturation of oocytes and the development of cattle embryos in vitro // Problems of biology of productive animals - 2018. No. 3. pp. 45-53.  
 8.Singina G.N., Shedova E.N. Maturation of cow oocytes in fert-talp medium increases their quality and competence for development in vitro // Agricultural biology, - 2019, v. 54, no. 6. P. 1206-1213.  
 9.Golubets L.V. Efficiency of using estrous serum in in vitro cultural systems / Golubets L.V., Starovoitova M.P., Otroshchenko A.E. // Zootechnical Science of Belarus, - 2009.- v. 44, no. 1. P. 37-44.  
 10.Akhmoldaeva A. M. Maturation and in vitro fertilization of cattle oocytes under the influence of biologically active substances/ A. M. Akhmoldaeva, N. I. Sergeev, I. A. Porfiryev // Agricultural biology - 2003. - No. 6. P. 58-65.  
 11.Golubets L.V., Letkevich L.L., Gandzha A.I., Simonenko V.P. Efficiency of using energy and hormonal supplements when obtaining cattle embryos outside the body / Golubets L.V., Letkevich L.L., Gandzha A.I., Simonenko V.P. // Zootechnical Science of Belarus, - 2003. - Volume 3. – P. 27-32.  
 12.Bakovetskaya O. V. Patterns and mechanism of functioning of the reproductive system of cows and mares during estrus and the development of a method for determining the optimal time of insemination. Doctoral dissertation, 2006, Ryazan.  
 13.Naoko Kubo, Ilse Silvia Cayo-Colca. Effect of estradiol-17 $\beta$  during in vitro growth culture on the growth, maturation, cumulus expansion and development of porcine oocytes from early antral follicles. Takashi Miyano Anim Sci J. – 2015. - No. 86(3). P. 251-259. DOI: 10.1111/asj.12283.  
 14.Beker I, Colenbrander B, Bevers M. Effect of 17beta-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes Theriogenology 2002 Dec;58(9). P. 1663-1673  
 15.Yon Soepri Ondho, Daud Samsudewa, Dela Ayu Lestari in vitro Maturation of Ovine Oocytes Using Follicle Stimulating Hormone (FSH), Estradiol-17 $\beta$ , and Co-Culture of Fallopian Tube Epithelial Cells (FTEC) in Tissue Culture Medium-199 (TCM-199) Int J Vet Sci, 2020, 9(1). P. 66-71.