

УДК: 636.1.082.4:(576.372+612.1)
DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.2.285

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ООЦИТОВ У КОБЫЛ, ИСПОЛЬЗУЮЩИХСЯ В ПРОГРАММАХ ВРТ, ПО БИОХИМИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ Фолликулярной жидкости И СЫВОРОТКИ КРОВИ

Калашников В. В.¹ – акад. РАН, д-р с.-х. наук, проф., науч. рук. (ORCID 0000-0001-9845-1691); Лебедева Л.Ф.^{1*} – д-р с.-х. наук, доц., зав. лаб. физиологии (ORCID 0000-0001-6960-5233); Солодова Е.В.¹ – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-3495-3478); Баковецкая О.В.² – д-р биол. наук, проф., зав. каф. биологии (ORCID 0000-0002-8102-4463).

¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства»,

² ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова

*Lebedeva-L18@yandex.ru

Ключевые слова: сыворотка крови, фолликулярная жидкость (ФЖ), ОПУ, биохимический анализ, качество ооцитов, ВРТ.

Key words: blood serum, follicular fluid (FF), OPU, biochemical analysis, oocyte quality, ART.

Финансирование: Материалы подготовлены в рамках конкурса Российского научного фонда 2022 года «Проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований отдельными научными группами» (Проект № 23-16-00226).

Поступила: 12.03.2024

Принята к публикации: 10.06.2024

Опубликована онлайн: 28.06.2024

РЕФЕРАТ



Исследован биохимический состав жидкости, содержащейся в фолликулах кобыл, а также установлен уровень идентичности данного состава биохимическим показателям их крови. В результате исследований показано, что в фолликулярной жидкости (ФЖ) крупных фолликулов (≥ 37 мм) содержится значительно больше электролитов - Na, K, P и сывороточного железа, но существенно меньше общего белка, мочевой кислоты, холестерина, триглицеридов, ХС ЛПВП и внутриклеточных ферментов - АЛТ, АСТ, КФК, ЛДГ, ГГТП, ЩФ, чем в сыворотке крови ($p < 0,05$). При этом не найдено достоверных различий по содержанию в исследованных средах глюкозы, мочевины, магния, альбумина, всех видов билирубина, креатинина, ХС ЛПНП, альфа-амилазы, кальция. Показано наличие корреляционных связей между количественными показателями большинства компонентов биохимического состава ФЖ и сыворотки крови, а в самой ФЖ - между компонентами липидного профиля с кальцием, фосфором, глюкозой, альбумином. Значимые связи установлены также между содержанием в ФЖ и сыворотке крови сывороточного Fe, Mg, Ca, общего белка, мочевины, холестерина, триглицеридов, внутриклеточных ферментов - АЛТ, АСТ, КФК, ЛДГ, ГГТП, ЩФ, билирубина и креатинина ($p < 0,05$). Полученные

статистически достоверные экспериментальные данные могут быть использованы для прогностической оценки состава фолликулярной жидкости и соответствующего качества ооцитов по биохимическому анализу сыворотки крови кобыл. Полученные статистически достоверные экспериментальные данные могут быть использованы для прогностической оценки состава фолликулярной жидкости и соответствующего качества ооцитов по биохимическому анализу сыворотки крови кобыл.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Одним из способов повышения результативности процедур ВРТ (ЭКО и ИКСИ) является прогнозирование качества ооцита, от которого зависит успех оплодотворения и дальнейшее развитие эмбриона. Ооцит развивается в окружении фолликулярной жидкости (ФЖ), которая является продуктом, как переноса компонентов плазмы крови, пересекающих фолликулярный барьер, так и секреторной активности гранулезных и текальных клеток фолликула [1]. ФЖ – это естественная полноценная среда для созревания ооцита. К функциям ФЖ относят: регуляцию функционирования гранулезных клеток и стероидогенеза, начало роста, созревание, овуляцию фолликула, транспортировку ооцита в яйцевод и развитие желтого тела. [2]. На всех стадиях роста и/или атрезии фолликула происходит тесное взаимодействие между ооцитом, гранулезными, текальными и интерстициальными клетками, необходимое как для развития самого фолликула, так и созревающего в нем ооцита.

Состав фолликулярной жидкости аналогичен сыворотке крови в отношении компонентов с низкой молекулярной массой [3]. Исследования показали, что «гематофолликулярный барьер» проницаем для белков массой ниже 500 кДа, поэтому большинство белков и других компонентов легко проходят через базальную пластинку и попадают в антральный отдел фолликула или, наоборот, выходят в системный кровоток. Ряд растворимых факторов, обнаруженных в фолликулярной жидкости, секретируется в клетках стенки фолликула [4]. По мере развития фолликула, гранулезные клетки производят высокомолекулярные полисахариды, стероидные гормоны и факторы роста, которые не могут преодолеть фолликуло-

гематологический барьер. Это создает осмотический градиент, который приводит к накоплению фолликулярной жидкости, образованию и увеличению антрального отдела фолликула [5]. Таким образом, стенка фолликула подобна грубому молекулярному сити с существующим барьером для крупных молекул на уровне базальной пластинки фолликула и капилляров теки [6].

Во время нормального фолликулогенеза состав фолликулярной жидкости демонстрирует динамические колебания в результате того, что отдельные типы клеток гранулезного и текального слоя реагируют на гонадотропины путем секреции различных гормонов, факторов роста и цитокинов, которые, в свою очередь, влияют на развитие/функцию как соматических клеток, так и ооцита. Так, у кобыл было идентифицировано в фолликулярной жидкости, собранной во время эстральной и лютеиновой фаз цикла, девять стероидных гормонов, включая эстрогены, прогестагены и андрогены [1,5]. 17 β -эстрадиол был идентифицирован как доминирующий стероид в фолликулярной жидкости, концентрация которого, также как и прогестерона и андростендиона, в 1000 раз выше, чем в сыворотке крови, в то время как гипофизарные гормоны не имеют дифференциальных отличий в концентрации [6]. Установлено, что 17 β -эстрадиол усиливает цитоплазматическое созревание ооцитов посредством прямого (негеномного) действия на уровне плазматической мембраны, индуцируя внеклеточный приток кальция в клетку и специфический паттерн колебаний Ca²⁺ [7]. Кальций участвует в мейотических клеточных циклах ооцитов млекопитающих. Было показано, что уровень Ca²⁺ увеличивается после высвобождения лютеинизирующего гормона [8]. Внутрикле-

точный рост кальция является основой созревания, активации и оплодотворения ооцитов [9, 10]. Полагают, что кальций играет важную роль в гонадотропиновой регуляции стероидогенеза яичников и овуляции. Повышенную концентрацию натрия в фолликулярной жидкости связывают с жизнеспособностью фолликулов и активным фолликулярным синтезом эстрогена [11].

Стероидные гормоны яичников влияют и на экскреторную функцию кобыл. Во время полового цикла происходят изменения в регуляции жидкости и электролитов в организме [9]. Концентрация электролитов в сыворотке крови, таких как Na^+ и Cl^- , значительно увеличивается в день овуляции. После овуляции у кобыл наблюдается самая высокая концентрация K^+ . Найдены корреляция уровней натрия, калия и хлоридов с уровнями прогестерона и эстрадиола [12].

До наступления подъема уровня лютеинизирующего гормона ооциты в эстральных фолликулах находятся на стадии остановки мейоза, которую обеспечивают факторы, ингибирующие мейоз. Установлено, что ингибирование происходит, главным образом, благодаря постоянно повышенным концентрациям циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) [13]. Эффективным медиатором возобновления мейоза считается FF-MAS (follicular fluid meiosis-activating sterol) - стерол, который является промежуточным звеном в биосинтезе холестерина между ланостеролом и холестерином [14]. Установлено, что общая концентрация FF-MAS увеличивается во время созревания фолликула. Значительное увеличение скорости достижения ооцитами стадии метафазы II наблюдалось после добавления 3 мкл FF-MAS во время созревания ооцитов *in vitro* (86% в обработанных ооцитах против 58% в необработанных ооцитах) [15].

По-видимому, на качество ооцита оказывает значительное влияние общая антиоксидантная способность фолликулярной жидкости. Концентрация антиоксидантных ферментов (глутатиона, глутатионре-

дуктазы и супероксиддисмутазы) варьирует в зависимости от размера фолликула и стадии эстрального цикла [16].

Липидный обмен является мощным источником энергии, и его важность во время созревания ооцитов получает все большее подтверждение. Присутствие липидов, особенно насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, в системах созревания *in vitro* влияет на содержание липидов в ооцитах, а также на их способность к развитию. [17].

Исследования на лошадях демонстрируют, что митохондриальная функция в ооцит-кумулясных комплексах (ОКК) снижается в средах с повышенным содержанием глюкозы, что ассоциировалось со снижением АТФ-связанного дыхания и увеличением немитохондриального дыхания в процессе созревания. Вместе с тем не было отмечено никакой разницы в созревании ооцитов или скорости формирования бластоцист лошадей после оплодотворения *in vitro* в средах с разным содержанием глюкозы [18]. Другие авторы также не увидели разницы в результатах культивирования эмбрионов, полученных методом ICSI, в средах с концентрацией глюкозы 5, 10 и 17,5 ммоль/л [19].

На практике, включение фолликулярной жидкости как добавки в среду для созревания ооцитов положительно влияет на скорость созревания ооцитов и развитие полученных эмбрионов. Так, установлено, что чистая преовуляторная фолликулярная жидкость лошадей, собранная после стимуляции ГнРГ, превосходит по уровню ядерного и цитоплазматического созревания ооцитов стандартные питательные среды [20]. Несомненно, некоторые биохимические характеристики фолликулярной жидкости могут играть решающую роль в определении качества ооцита, последующего потенциала достижения оплодотворения и развития эмбриона [16]. В свою очередь, изменение состава фолликулярной жидкости отражает изменения в компонентах плазмы крови, связанные с физиологическими или патологическими состояниями, а также развитие секреторных процессов в гранулёзном и

внутреннем слое теки фолликула. Поскольку барьерные свойства фолликулярной стенки изменяются во время роста фолликула, то можно ожидать и изменения биохимического состава фолликулярной жидкости по мере его развития [3].

Однако до настоящего времени не установлено четкого соответствия между специфическими биохимическими характеристиками фолликулярной жидкости и измеримыми переменными, связанными с качеством ооцитов и эмбрионами у лошадей. Более того, исследования фолликулярной жидкости кобыл не показали однозначных результатов по содержанию холестерина, глюкозы, триглицеридов и других элементов в сыворотке крови и фолликулярной жидкости [1, 12, 20, 21, 22, 23].

Так как ФЖ, извлекаемая из преовуляторных фолликулов в процессе процедур OPU (Ovum PickUp – трансвагинальная аспирация ооцитов из яичников), является полноценной, доступной и дешевой средой для созревания ооцитов *in vitro*, изучение её характеристик методом биохимического и гормонального анализа продолжает быть актуальным в плане выявления прогностических переменных, связанных с качеством ооцита. Выявление корреляционных связей между компонентами фолликулярной жидкости и сывороткой крови может быть весьма полезным для предварительной оценки качества фолликулярной жидкости. Поэтому мы поставили перед собой следующие задачи: 1) определить средние, минимальные и максимальные значения биохимических показателей фолликулярной жидкости; 2) сравнить значения этих показателей с показателями сыворотки крови; 3) установить корреляционные связи биохимических компонентов фолликулярной жидкости и их связь с компонентами сыворотки крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

В поисках прогностических критериев, связанных с качеством ооцитов в программах BPT, проводились параллельные исследования биохимического состава

ФЖ из доминантных фолликулов кобыл, находящихся в эстральной фазе полового цикла, и сыворотки их крови. В исследование были включены 13 полновозрастных кобыл (в возрасте от 4 до 16 лет) верховых, тяжеловозных и аборигенных (вятской) пород, принадлежащих ФГБНУ ВНИИ коневодства. Содержание и кормление животных соответствовало принятым ветеринарным и зоотехническим нормам. Критериями включения кобыл в исследование являлись: нормальная половая цикличность, отсутствие хронических и острых заболеваний репродуктивных органов (выявляемых при клиническом обследовании) в течение месяца до начала забора фолликулярной жидкости. Динамику полового цикла у кобыл, в том числе развитие фолликулов, контролировали с помощью ультразвукового сканера Ехаго (Франция). В период диэструса контроль проводили через 3-4 дня, а с начала эструса - ежедневно. Фолликулярную жидкость из эстральных фолликулов диаметром ≥ 37 мм извлекали методом трансвагинальной аспирации под ультразвуковым контролем (OPU). Перед каждой процедурой проводили забор крови у кобыл из яремной вены, отстаивали в течение 30 минут и центрифугировали в режиме 3000 об/мин в течение 15 минут, после чего полученную сыворотку замораживали.

Кобыл вначале процедуры OPU седировали детомидина гидрохлоридом (препарат «Домоседан», Zoetis-Pfizer, США) в дозе 0,2 - 0,5 мг внутривенно, добавляя по мере необходимости в несколько приемов в течение процедуры. После первой инъекции домоседана проводили эпидуральную анестезию 2% лидокаином (4-7 мл). За 15 минут до начала процедуры вводили флюнексин меглумин (300-500 мг) и антибиотик ветбицин-3 (10 000 – 15 000 ЕД на 1 кг массы животного).

Чистую фолликулярную жидкость извлекали перед промыванием фолликула (для извлечения ооцита) с помощью вакуумного насоса COOK Medical K-MAR-5200. Фолликулы аспирировали через

двухпросветную иглу калибра 12G, которую вводили с помощью модифицированного эндовагинального зонда со встроенным микроконвексным датчиком в комплектацию к ультразвуковому сканеру EXAGO. Фолликулярную жидкость из каждого фолликула собирали в отдельный флакон объемом 50 мл, центрифугировали в режиме 3000 об/мин в течение 20 минут и разливали в пробирки эппендорф по 2 мл, после чего аликвоты замораживали и хранили при -18°C . Биохимический анализ сыворотки крови и фолликулярной жидкости проводили на биохимическом анализаторе Stat Fax 1904+ (Производитель: Awareness technology) на базе ЦКП «Коллекция генетических ресурсов» ФГБНУ «ВНИИ коневодства». Полученные данные обрабатывали с помощью программы Statistica 12, с использованием критерия Стьюдента для оценки достоверности данных. Для анализа корреляционной связи между группами показателей использовали коэффициент корреляции Спирмена. Опыт по исследованию фолликулярной жидкости был одобрен комиссией по этике (Протокол № 8-23 от 28.11.2023 г.), созданной при ФГБНУ «ВНИИ коневодства».

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Биохимический анализ полученных данных выявил статистически значимые различия ($p < 0,05$) между средними концентрациями электролитов Na, K, P, сывороточного железа, общего белка и мочевины, а также между составляющими липидного профиля (холестерина, триглицеридов, ХС ЛПВП) и внутриклеточными ферментами (АЛТ, АСТ, КФК, ЛДГ, ГГТП, ЩФ) в фолликулярной жидкости и сыворотке крови (Таблица 1). Достоверная разница в содержании Mg, Ca, глюкозы в крови и фолликулярной жидкости не установлена.

Корреляционные связи между элементами в двух биологических субстратах представлены на Рисунке 1. Наиболее тесная связь при уровне значимости $p < 0,05$ выявлена в содержании АСТ ($r = 0,92$), а также креатинина, КФК, общего и прямого билирубина ($r \geq 0,8$). Значитель-

ная положительная связь найдена между содержанием в сыворотке крови и фолликулярной жидкости сывороточного железа и кальция ($r = 0,53$ и $r = 0,52$, соответственно, $p < 0,05$), тесная положительная связь ($r = 0,77$; $p < 0,05$) – между содержанием магния.

Уровень общего белка и мочевины достоверно ниже в фолликулярной жидкости, чем в сыворотке крови ($p < 0,05$). Средние показатели концентрации мочевины, альбумина и креатинина не имеют достоверных различий.

В наших исследованиях концентрация компонентов липидного профиля – триглицеридов, холестерина и ХС ЛПВП также меньше в фолликулярной жидкости, чем в сыворотке крови ($p < 0,05$). Однако разница в средней концентрации ХС ЛПВП не достигает статистической значимости. Холестерин, присутствующий в фолликулярной жидкости, связан с фракцией липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), поскольку единственная другая фракция липопротеинов, содержащая холестерин – фракция липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) – слишком велика, чтобы пройти через гематофолликулярный барьер. Ранее было показано, что холестерин ЛПВП в фолликулярной жидкости положительно коррелирует с холестерином ЛПВП в сыворотке [24, 25]. Результаты исследований D Le Goff (1994) привели к предположению, что хотя ЛПВП фолликулярной жидкости, по-видимому, являются продуктом фильтрации ЛПВП плазмы, они подвергаются метаболическим преобразованиям, которые могут быть связаны с синтезом гормонов и обратным переносом холестерина [26].

Анализ содержания внутриклеточных ферментов в фолликулярной жидкости показал, что средняя концентрация КФК, ЩФ, ГГТП, ЛДГ, АЛТ и АСТ достоверно ниже, чем в сыворотке крови ($p < 0,05$). Средняя концентрация пищеварительного фермента α -амилазы значительно ниже в фолликулярной жидкости, чем в сыворотке крови, но данная разница не имеет статистической значимости.

Таблица 1 – Сравнение биохимических показателей сыворотки крови и фолликулярной жидкости кобыл (n=17)

Показатель	Ед.изм.	Кровь			Фолликулярная жидкость		
		M±m	меди-ана	Min-Max	M±m	меди-ана	Min-Max
Калий*	ммоль/л	3,57±0,38	3,5	3,04-4,3	4,04±0,48	4,03	3,1-5,1
Сыв.железо*	ммоль/л	38,03±7,8	36,6	24,4-54,25	50,87±10,20	49,7	38-77,8
Фосфор*	ммоль/л	0,87±0,3	0,89	0,43-1,63	1,08±0,30	1,04	0,6-2,0
Натрий*	ммоль/л	142,56±1,71	142,0	140-146	144,0±2,06	144,0	140-146
Магний	ммоль/л	0,85±0,18	0,79	0,67-1,38	0,91±0,26	0,81	0,55-1,53
Глюкоза	ммоль/л	4,83±0,5	4,85	3,94-5,83	4,93±0,70	5,05	3,42-6,23
О.белок*	г/л	73,59±6,5	76,0	63,0-82,0	53,10±8,25	54,0	35-64
Мочевина	ммоль/л	2,9±0,4	2,75	2,2-4,1	2,70±0,30	2,61	2,2-3,4
Моч.кислота*	мкмоль/л	19,0±7,32	20,0	8,0-35,0	11,40±5,20	9,0	6,0-25,0
Холестерин*	ммоль/л	2,04±0,37	2,0	1,45-2,79	1,17±0,35	1,2	0,53-1,63
Триглицериды*	ммоль/л	0,15±0,09	0,17	0,02-0,3	0,01±0,27	0,08	0,01-0,4
ХС ЛПВП*	ммоль/л	1,61±0,24	1,6	1,1-2,0	1,01±0,27	1,1	0,48-1,4
АЛТ*	Е/л	7,2±1,6	8,0	5,0-10,0	6,4±1,2	6,0	4-9
АСТ*	Е/л	234,75±78,74	240,0	90-390	212,37±78,3	207,5	60-330
КФК*	Е/л	129,47±48,53	116,0	63-215	44,86±22,54	39	14-97
ЛДГ*	Е/л	506,52±124,4	529,0	289-721	395,0±122,0	402,0	207-593
ГГТП*	Е/л	14,31±6,2	12,5	6,0 -24	10,06±3,06	10,0	6-17
ЩФ*	Е/л	262,8±77,25	242,0	121-398	156,6±42,10	1450,0	92-236
Альбумин	г/л	31,94±5,49	33,0	23-41	30,0±4,35	29,0	24-40
Билирубин общий	мкмоль/л	15,69±4,9	16,47	9,97-24,7	14,67±5,24	12,7	9.87-26,7
Билирубин прямой	мкмоль/л	3,1±1,0	3,2	2,0-5,0	2,8±1,10	2,15	2,0-5,40
Билирубин не прямой	мкмоль/л	10,8±5,04	8,7	3,2-19,7	10,87±5,08	8,4	3,2-22,2
Креатинин	мкмоль/л	92,7±9,5	92,0	77-108	90,11±11,89	92,0	66-113
ХС ЛПНП	ммоль/л	0,33±0,34	0,16	0,01-1,15	0,25±0,21	0,16	0,01-0,7
а-амилаза	Е/л	4,7±3,7	5,0	0-16	2,88±2,93	2,0	0-9
Кальций	ммоль/л	2,90±0,26	2,83	2,58-3,53	2,83±0,64	2,65	1,97-4,38

* $p < 0,05$

Разница в содержании билирубина общего, прямого и непрямого не достоверна, но наблюдается тесная положительная связь ($r=0,83$; $0,8$; $0,73$, соответственно, $p < 0,05$) между их содержанием в сыворотке и фолликулярной жидкости.

Результаты проведенного нами сравнительного исследования биохимического состава сыворотки крови и фолликулярной жидкости из крупных эстральных фолликулов у кобыл подтверждают результаты аналогичных исследований по

содержанию общего белка, общего билирубина, альбумина, мочевины, Са, ферментативной активности ЩФ, ГГТП, АСТ, показанные в работе А. Collins et al. [21] и K.Satue et al. [12], но противоречат результатам данных авторов по содержанию холестерина и триглицеридов. Более высокие концентрации компонентов липидного профиля, обнаруженные в нашей работе, подтверждаются исследованиями D. Le Goff [26], где показано более высокое содержание ХС ЛПВП в сыворотке,

чем в фолликулярной жидкости. В нашем исследовании так же, как и в исследовании A. Collins et al. [21], найдена высокая положительная корреляция между содержанием общего билирубина, мочевины и креатинина, АСТ в сыворотке крови и фолликулярной жидкости. Аналогично работе K.Satue et al. [12], обнаружена более высокая положительная корреляционная связь между содержанием в сыворотке крови и фолликулярной жидкости триглицеридов и холестерина. Однако в отличие от K.Satue et al., мы нашли более значительное содержание электролитов Na, K, P в фолликулярной жидкости, чем в сыворотке крови ($p < 0,05$).

Учитывая отсутствие статистически значимых различий и тесную положительную связь ($r = 0,73 - 0,83$; $p < 0,05$) общего, прямого и непрямого билирубина между кровью и фолликулярной жидкостью можно сказать, что этот пигмент беспрепятственно поступает в фолликулярную жидкость через стенку эстрального фолликула. Корреляции между видами билирубина в фолликулярной жидкости аналогичны корреляциям в крови. Отрицательное влияние на физиологические

функции организма оказывает не прямой билирубин. Так как этот пигмент легко проникает в клетки и нарушает их жизнедеятельность, он достаточно токсичен. Это подтверждается установленной его значительной отрицательной связью ($0,53 - 0,57$), как с холестерином, ХС ЛПВП, КФК, ЛДГ в фолликулярной жидкости, так и с общим белком и АЛТ в сыворотке крови.

Найдена значительная и тесная связь между уровнем общего белка, мочевины и креатинина в сыворотке крови и фолликулярной жидкости ($r = 0,68$; $r = 0,7$ и $r = 0,87$; $p < 0,05$). Однако корреляция между содержанием мочевой кислоты в сыворотке крови и фолликулярной жидкости отсутствует. Аналогично отрицательной связи уровня мочевины и общего белка в сыворотке крови, обнаружена значительная отрицательная связь между мочевиной сыворотки крови и общим белком фолликулярной жидкости ($r = -0,62$; $p < 0,05$). В фолликулярной жидкости эта связь также отрицательна, но не имеет статистической значимости ($r = -0,33$). Как в сыворотке крови, так и в фолликулярной жидкости, и между двумя субстрата-

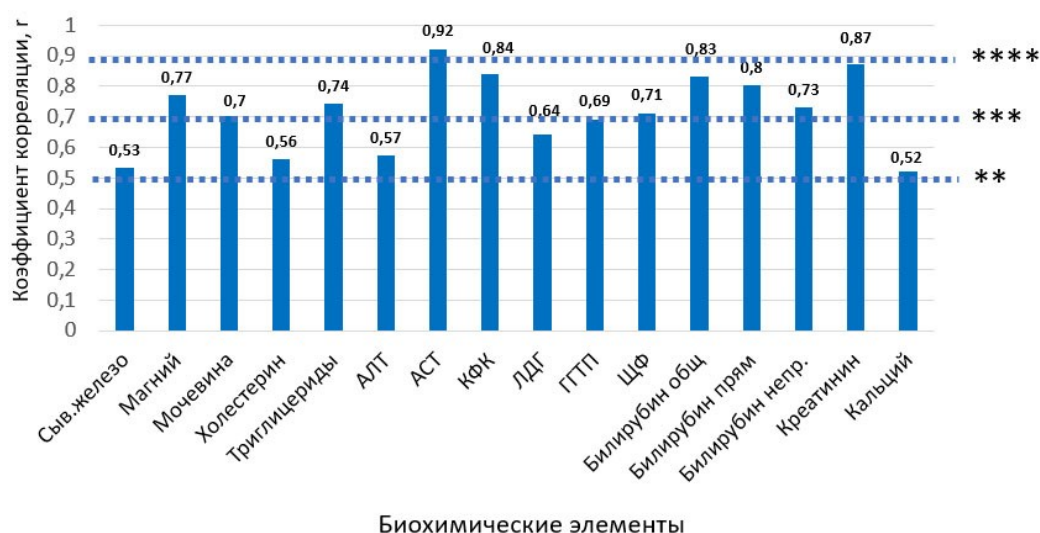


Рисунок 1 – Корреляционная связь между биохимическими показателями в фолликулярной жидкости и крови кобыл при $p < 0,05$ (r^{**} - связь значительная, r^{***} - тесная, r^{****} - очень тесная).

ми повторяется отрицательная корреляционная связь (r в пределах от $(-0,55)$ до $(-0,78)$; $p < 0,05$) между активностью АСТ и мочевиной, а также положительная связь ($r = 0,5$, $p < 0,05$) между общим белком и кальцием.

Найдена значительная и тесная положительная корреляция между содержанием холестерина и триглицеридов ($r = 0,57$ и $r = 0,74$, соответственно, $p < 0,05$) в сыворотке крови и фолликулярной жидкости. Умеренно положительная связь между системными триглицеридами и фолликулярными ХС ЛПВП, тесная положительная между холестерином и ХСЛПВП ($r = 0,89$; $p < 0,05$) фолликулярной жидкости и незначительное содержание ХС ЛПНП в фолликулярной жидкости говорит о том, что через фолликулярную стенку в основном проходят ХС ЛПВП. ХС ЛПВП считается молекулой, обеспечивающей холестерином клетку в качестве субстрата для стероидогенеза в стенке фолликула. ХС ЛПВП обладают также мощным противовоспалительным и антиоксидантным действием [24]. Значительная отрицательная связь ($r = -0,5$; $p < 0,05$) между содержанием кальция и триглицеридов в крови и фолликулярной жидкости, а также в самой фолликулярной жидкости ($r = -0,6$; $p < 0,05$) подтверждает связь кальциевого и липидного обмена в организме. Найдены также положительные значительные связи между ХС ЛПВП и глюкозой, как в фолликулярной жидкости ($r = 0,62$; $p < 0,05$), так и в крови ($r = 0,73$; $p < 0,05$). Только в фолликулярной жидкости установлена положительная связь между холестерином и альбумином ($r = 0,63$; $p < 0,05$) и отрицательная – между ХС ЛПВП и фосфором ($r = -0,67$; $p < 0,05$).

Очень тесная и тесная положительная связь наблюдается между содержанием в сыворотке и фолликулярной жидкости АСТ, КФК, ЩФ ($r = 0,92$; $0,84$; $0,71$ соответственно, $p < 0,05$) и значительная – между АЛТ, ЛДГ и ГГТП ($r = 0,57$; $0,64$ и $0,69$, соответственно; $p < 0,05$).

Обнаруженные нами корреляционные связи между элементами ФЖ содержат ин-

формацию, полезную для оценки качества среды, в которой происходит развитие ооцита. Некоторые биохимические характеристики ФЖ, окружающей ооцит, могут играть решающую роль в определении его качества и последующего потенциала для достижения оплодотворения и развития эмбриона. В частности, известно, что избыток глюкозы в среде для созревания ооцитов ухудшает развитие ооцитов крупного рогатого скота до стадии бластоцисты, [27]. С другой стороны, характер связей между компонентами ФЖ и сыворотки крови может также дать важную информацию о том, как метаболические изменения в системном кровотоке отражаются на составе ФЖ [28]. Однако наши результаты и исследования других авторов демонстрируют высокую индивидуальную вариабельность в уровне биохимических показателей в крови и фолликулярной жидкости у животных и человека, что требует уточнения ее истинных причин (возраст, клинические характеристики, гормональный статус и др.) и связей с качеством фолликула [6].

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Биохимический анализ выявил статистически значимые различия между средними концентрациями электролитов Na, K, P, сывороточного железа, общим белком и мочевой кислотой, составляющими липидного профиля (холестерина, триглицеридов, ХС ЛПВП) и внутриклеточными ферментами (АЛТ, АСТ, КФК, ЛДГ, ГГТП, ЩФ) в фолликулярной жидкости и сыворотке крови. Обнаруженные как положительные, так и отрицательные корреляционные связи между основными показателями белкового, липидного, углеводного и минерального обмена в двух биологических субстратах, могут служить ориентирами нарушений физиологических функций в организме, отражающими сдвиги показателей биохимического состава крови, приводящие к изменениям в показателях фолликулярной жидкости. Полученные статистически достоверные экспериментальные данные могут быть использованы для прогностической оценки состава фолликулярной жидкости и

соответствующего качества ооцитов по биохимическому анализу сыворотки крови кобыл.

PROGNOSTIC ASSESSMENT OF OOCYTE QUALITY IN MARES USED IN ART PROGRAMS BASED ON BIOCHEMICAL PARAMETERS OF FOLLICULAR FLUID AND BLOOD SERUM

Kalashnikov V.V.¹ – acad. RAS, Doctor of Agricultural Sciences, prof., Scientific director (ORCID 0000-0001-9845-1691); **Lebedeva L.F.**¹ * – Doctor. Agricultural Sciences, Associate Professor, Head of Physiology lab. (ORCID 0000-0001-6960-5233); **Solodova E.V.**¹ – Candidate of Biol. Sciences, scientific co-workers (ORCID 0000-0003-3495-3478); **Bakovetskaya O.V.**² – Doctor of Biology. Sci. prof., Head of Biology department (ORCID 0000-0002-8102-4463).

¹The All-Russian Research Institute for Horse breeding

²Ryazan State Medical University named after Academician I.P. Pavlov

*Lebedeva-L18@yandex.ru

Financing: *The materials were prepared within the framework of the 2022 competition of the Russian Science Foundation "Conducting fundamental scientific research and exploratory scientific research by individual scientific groups" (Project No. 23-16-00226).*

ABSTRACT

The biochemical composition of the mare's follicle fluid was studied, and the level of identity of this composition with the biochemical parameters of their blood was established. It has been shown that the follicular fluid (FF) of large follicles (≥ 37 mm) contains significantly more electrolytes – Na, K, P and serum Fe, but significantly less total protein, uric acid, cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol and intracellular enzymes - ALT, AST, CPK, LDH, GGTP, alkaline phosphatase, than in blood serum ($p < 0.05$). At the same time, no significant differences were found in the content of glu-

cose, urea, magnesium, albumin, all types of bilirubin, creatinine, LDL cholesterol, alpha-amylase, and calcium in the studied media. The presence of correlations has been shown between the quantitative indicators of most components of the biochemical composition of the FF and blood serum, and in the FF itself - between the components of the lipid profile with Ca, P, glucose, and albumin. Significant relationships were also established between the content of serum Fe, Mg, Ca, total protein, urea, cholesterol, triglycerides, intracellular enzymes - ALT, AST, CPK, LDH, GGTP, alkaline phosphatase, bilirubin and creatinine in the FF and blood serum ($p < 0.05$). The obtained statistically reliable experimental data can be used for prognostic assessment of the composition of follicular fluid and the corresponding quality of oocytes based on biochemical analysis of blood serum in mares. The statistically reliable experimental data obtained can be used for a prognostic assessment of the composition of follicular fluid and the corresponding quality of oocytes by biochemical analysis of blood serum of mares.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Satué K. Can the Presence of Ovarian Corpus Luteum Modify the Hormonal Composition of Follicular Fluid in Mares? /K.Satué, E. Fazio, P.Medica// J.Animals.- 2020.-V.10 (4), P.646 <https://doi.org/10.3390/ani10040646>
2. Hafez E.S. Assisted reproductive technology/ E.S.Hafez, B. Hafez //In: Reproduction in farm animals. 7th ed, – Part VI. – 2008. – P.117-118. ISBN: 978-1-118-71028-9
3. Rodgers R.J. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. R. J. Rodgers, H. F. Irving-Rodgers//J.Biol. Reprod.- 2010.-V.82(6)-P.1021-1029. DOI:10.1095/biolreprod.109.082941
4. Fahiminiya S. Proteomic analysis of mare follicular fluid during late follicle development/S.Fahiminiya, V. Labas, S. Roche, J.L.Dacheux, N. Gérard// J.Proteome Sci., 2011.-V.9(54).-P.1 doi: 10.1186/1477-5956-9-54.
5. Baskind N. Follicular Fluid Hormone Pro-

- files in Natural Cycle IVF Patients During Follicular Phase/ N. Baskind, V.Sharma// In book: Development of In Vitro Maturation for Human Oocytes, 2017.-P.105-128. DOI:10.1007/978-3-319-53454-16.
- 6.Belin F. Intrafollicular Concentrations of Steroids and Steroidogenic Enzymes in Relation to Follicular Development in the Mare/ Belin F., Goudet G., Duchamp G., Gérard N. // Biol Reprod. 2000 May;62 (5):1335-43. doi: 10.1095/biolreprod62.5.1335.
- 7.Revelli A. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics/ A. Revelli, L. Delle Piane1, S. Casano, E. Molinari1, M. Massobrio1, P.Rinaudo//J.Reprod Biol. Endocrinol, 2009.-V.7(40) doi: 10.1186/1477-7827-7-40.
- 8.Sun B. Calcium Oscillatory Patterns and Oocyte Activation During Fertilization: A Possible Mechanism for Total Fertilization Failure (TFF) in Human In Vitro Fertilization? / B.Sun, J. Yeh //J.Reprod. Sci., 2021.-V.28(3).-P.639. DOI: 10.1007/s43032-020-00293-5ю
- 9.Gałęska E. Reproductive Consequences of Electrolyte Disturbances in Domestic Animals/ E. Gałęska, M.Wrzecińska, A.Kowalczyk, J.P. Araujo //J.Biology (Basel), 2022.-V.11(7).-P.1006. doi: 10.3390/biology11071006.
10. Pawliński B. Acid-Base, Gas, Ions, and Glucose Analysis in Follicular Fluid in Holstein-Friesian Dairy Cows Is Associated with the Follicle Size in Poland B.Pawliński, M.Petrajtis-Gołobów, M.Trela, O.Witkowska-Piłaszewicz /Animals (Basel), 2023.-V.13(10).-P.1636. doi: 10.3390/ani13101636.
- 11.Asgharimoghadam M. Biochemical Composition of Blood Plasma and Follicular Fluid in Relation to Follicular Size in Sheep / Asgharimoghadam M., Hasanpoor K., Karamzadeh A., Yoosefian I.//Indian Journal of Natural Sciences Vol.5 / Issue 29/ April 2015.
- 12.Satué K. Endocrine and Electrolyte Balances during Periovarulatory Period in Cycling Mares/K.Satué, E.Fazio, A. Muñoz, P.Medica//J.Animals (Basel), 2021.-V.11 (2).-P.520 doi: 10.3390/ani11020520.
- 13.Pei Z. The molecular regulatory mechanisms of meiotic arrest and resumption in Oocyte development and maturation/ Z.Pei, K.Deng, C.Xu, S.Zhang // J.Reprod Biol Endocrinol, 2023.-V.21(1).-P.90. doi: 10.1186/s12958-023-01143-0.
- 14.Rozman D. (2002). Lanosterol 14-demethylase and MAS sterol in mammalian gametogenesis/ D.Rozman, M.Cotman, R. Frangez//J. Mol. Cell Endocrinol, 2002.-V.187.-P.179–187. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00693-1](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00693-1)
- 15.Donnay I. Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes / I.Donnay, I.Faerge, C.Grøndahl, B.Verhaeghe, H. Sayoud, N.Ponderato, C.Galli, G.Lazzari //Theriogenol, 2004. -V.62(6). P, 1093–1107. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.019>
16. Mohammed A.E. Effects of Follicular Fluid Components on Oocyte Maturation and Embryo Development In vivo and In vitro/ A. E. Mohammed, S. Al-Suwaiegh, T. Al-Shaheen //J.Advances in Animal and Veterinary Sciences,2019.-V.7(5).-P.346 DOI <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2019/7.5.346.355>.
- 17.Dunning K.R. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. /Dunning K.R., Russell D.L., Robker R.L. //Reproduction. 2014;148:R15–27.
- 18.Lewis N. Glucose concentration during equine in vitro maturation alters mitochondrial function /Lewis N., Hinrichs K. , Leese H.J., McGregor Argo C., Brison D.R., Sturme R.G. //Reproduction . 2020 ;160(2):227-237. doi: 10.1530/REP-20-0032
- 19.Sanchez-Calabuig M. A high glucose concentration during early stages of in vitro equine embryo development alters expression of genes involved in glucose metabolism. /Sanchez-Calabuig M., Fernandez-Gonzalez R., Hamdi M, Smits K. (UGent) , Lopez-Cardona A.P., Serres C., Macias-Garcia B., Gutierrez-Adan A. //Eqine Veterinary Journal. - 2021: 53(4). p.787-795.

20. Bøgh I.B. Pure preovulatory follicular fluid promotes in vitro maturation of in vivo aspirated equine oocytes/ I. B. Bøgh, J. Bé-zard, G. Duchamp, M. Baltsen, N. Gérard, P. Daels, T. Greve// *Theriogenology*, 2002. -V.57(7). - P.1765-1779. doi: 10.1016/s0093-691x(02)00650-7.
21. Collins A. A comparison of the biochemical composition of equine follicular fluid and serum at four different stages of the follicular cycle/ A. Collins, E. Palmer, J. Bé-zard, J. Burke, G. Duchamp, T. Buckley// *J.Equine Vet*, 1997.- Suppl. 25.-P.12-16. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1997.tb05092.x
22. Satué K. Hematochemical Patterns in Follicular Fluid and Blood Stream in Cycling Mares: A Comparative Note /K. Satué, E. Fazio, A. Ferlazzo, P. Medica// *Journal of Equine Veterinary Science*, 2019.-V.80.-P.20-26 doi: 10.1016/j.jevs.2019.06.016
23. Boakari Y.L. Relationships between blood and follicular fluid urea nitrogen concentrations and between blood urea nitrogen and embryo survival in mares/ Y.L.Boakari, H.El-Sheikh Ali, M. Schnobrich, K. Lofrumento, C. Scoggin, E. Bradecamp, K.Scoggin, A.Esteller-Vico, A. Claes, L.Lawrence, B.Ball // *J.Theriogenology*, 2021.-V.160.-P.142-150. doi: 10.1016/j.theriogenology. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.10.039.
24. Gautier T., Human luteinized granulosa cells secrete apoB100-containing lipoproteins. / Gautier T., Becker S., Drouineaud V., Menetrier F., Sagot P., Nofer J.R., von Otte S., Lagrost L., Masson D. & Tietge U.J.// *Journal of Lipid Research*. -2010.- V.51.-P. 2245–2252. (Doi:10.1194/jlr.M005181)
25. Yang X., Exposure to lipid-rich follicular fluid is associated with endoplasmic reticulum stress and impaired oocyte maturation in cumulus–oocyte complexes. / Yang X., Wu L.L., Chura L.R., Liang X., Lane M., Norman R.J. & Robker R.L. // *Fertility and Sterility*. – 2012, - V.97.- P.1438–1443. (doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.02.034)
26. Le Goff D. Follicular fluid lipoproteins in the mare: evaluation of HDL transfer from plasma to follicular fluid/ D. Le Goff // *J. Biochim. Biophys. Acta*, 1994.-1210(2). P.226-232. DOI: 10.1016/0005-2760(94)90125-2
27. Hashimoto, S. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilisation: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. / Hashimoto, S., Minami, N., Yamada, M., Imai, H. // *Mol. Reprod. Dev.* - 2000.- V. 56, P.520–526.
28. Leroy J.L. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post-partum. / Leroy J.L., Vanholder T., Delanghe J.R., Opsomer G., Van Soom A., Bols P.E., Dewulf J., de Kruif A. // *Theriogenology*. - 2004, V.62. P.1131-1143.

REFERENCES

1. Satué K. Can the Presence of Ovarian Corpus Luteum Modify the Hormonal Composition of Follicular Fluid in Mares? /K. Satué , E. Fazio, P. Medica// *J.Animals*.- 2020.-V.10 (4), P.646 <https://doi.org/10.3390/ani10040646>
2. Hafez E.S. Assisted reproductive technology/ E.S.Hafez, B. Hafez //In: *Reproduction in farm animals*. 7th ed, - Part VI. - 2008. -P.117-118. ISBN: 978-1-118-71028-9
3. Rodgers R.J. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. R. J. Rodgers, H. F. Irving-Rodgers// *J.Biol. Reprod.*- 2010.-V.82(6)-P.1021-1029. DOI:10.1095/biolreprod.109.082941
4. Fahiminiya S. Proteomic analysis of mare follicular fluid during late follicle development/S.Fahiminiya, V. Labas, S. Roche, J.L.Dacheux, N. Gérard// *J.Proteome Sci.*, 2011.-V.9(54).-P.1 doi: 10.1186/1477-5956-9-54.
5. Baskind N. Follicular Fluid Hormone Profiles in Natural Cycle IVF Patients During Follicular Phase/ N. Baskind, V.Sharma// In book: *Development of In Vitro Maturation for Human Oocytes*, 2017.-P.105-128. DOI:10.1007/978-3-319-53454-16.
6. Belin F. Intrafollicular Concentrations of Steroids and Steroidogenic Enzymes in Relation to Follicular Development in the Mare/ Belin F., Goudet G., Duchamp G., Gérard N. // *Biol Reprod*. 2000 May;62 (5):1335-43. doi: 10.1095/

- biolreprod62.5.1335.
- 7.Revelli A. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics/ A. Revelli, L. Delle Piane1, S. Casano, E. Molinari1, M. Massobrio1, P.Rinaudo // J.Reprod Biol. Endocrinol, 2009.-V.7(40) doi: 10.1186/1477-7827-7-40.
- 8.Sun B. Calcium Oscillatory Patterns and Oocyte Activation During Fertilization: A Possible Mechanism for Total Fertilization Failure (TFF) in Human In Vitro Fertilization? / B.Sun, J. Yeh //J.Reprod. Sci., 2021.-V.28(3).-P.639. DOI: 10.1007/s43032-020-00293-5ю
- 9.Gałęska E. Reproductive Consequences of Electrolyte Disturbances in Domestic Animals/ E. Gałęska, M.Wrzecińska, A.Kowalczyk, J.P. Araujo //J.Biology (Basel), 2022.-V.11(7).-P.1006. doi: 10.3390/biology11071006.
10. Pawliński B. Acid-Base, Gas, Ions, and Glucose Analysis in Follicular Fluid in Holstein-Friesian Dairy Cows Is Associated with the Follicle Size in Poland B.Pawliński, M.Petrajtis-Gołobów, M.Trela, O.Witkowska-Piłaszewicz /Animals (Basel), 2023.-V.13(10).-P.1636. doi: 10.3390/ani13101636.
- 11.Asgharimoghadam M. Biochemical Composition of Blood Plasma and Follicular Fluid in Relation to Follicular Size in Sheep / Asgharimoghadam M., Hasanpoor K., Karamzadeh A., Yoosefian I.//Indian Journal of Natural Sciences Vol.5 / Issue 29/ April 2015.
- 12.Satué K. Endocrine and Electrolyte Balances during Perioovulatory Period in Cycling Mares/K.Satué, E.Fazio, A. Muñoz, P.Medica//J.Animals (Basel), 2021.-V.11(2).-P.520 doi: 10.3390/ani11020520.
- 13.Pei Z. The molecular regulatory mechanisms of meiotic arrest and resumption in Oocyte development and maturation/ Z.Pei, K.Deng, C.Xu, S.Zhang // J.Reprod Biol Endocrinol, 2023.-V.21(1).-P.90. doi: 10.1186/s12958-023-01143-0.
- 14.Rozman D. (2002). Lanosterol 14-demethylase and MAS sterol in mammalian gametogenesis/ D.Rozman, M.Cotman, R. Frangez//J. Mol. Cell Endocrinol, 2002.-V.187.-P.179–187. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00693-1](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00693-1)
- 15.Donnay I. Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes / I.Donnay, I.Faerge, C.Grøndahl, B.Verhaeghe, H. Sayoud, N.Ponderato, C.Galli, G.Lazzari //Theriogenol, 2004. - V.62(6).P, 1093–1107. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.019>
16. Mohammed A.E. Effects of Follicular Fluid Components on Oocyte Maturation and Embryo Development In vivo and In vitro/ A. E. Mohammed, S. Al-Suwaiegh, T. Al-Shaheen //J.Advances in Animal and Veterinary Sciences,2019.-V.7(5).-P.346 DOI <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2019/7.5.346.355>.
- 17.Dunning K.R. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. /Dunning K.R., Russell D.L., Robker R.L. //Reproduction. 2014;148:R15–27.
- 18.Lewis N. Glucose concentration during equine in vitro maturation alters mitochondrial function. /Lewis N., Hinrichs K. , Leese H.J., McGregor Argo C., Brison D.R., Sturme R.G. //Reproduction . 2020 ;160(2):227-237. doi: 10.1530/REP-20-0032
- 19.Sanchez-Calabuig M. A high glucose concentration during early stages of in vitro equine embryo development alters expression of genes involved in glucose metabolism. /Sanchez-Calabuig M., Fernandez-Gonzalez R., Hamdi M, Smits K. (UGent) , Lopez-Cardona A.P., Serres C., Macias-Garcia B., Gutierrez-Adan A. //Equine Veterinary Journal. - 2021: 53(4). p.787-795.
- 20.Bøgh I.B. Pure preovulatory follicular fluid promotes in vitro maturation of in vivo aspirated equine oocytes/ I. B. Bøgh, J. Bézard, G. Duchamp, M. Baltsen, N. Gérard, P. Daels, T. GrevePure// Theriogenology, 2002. -V.57(7).-P.1765-1779. doi: 10.1016/s0093-691x(02)00650-7.
- 21.Collins A. A comparison of the biochemical composition of equine follicular fluid and serum at four different stages of the fol-

- licular cycle/ A. Collins, E. Palmer, J. Bézard, J. Burke, G. Duchamp, T. Buckley// *J.Equine Vet*, 1997.- Suppl. 25.-P.12-16. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1997.tb05092.x
- 22.Satué K. Hematochemical Patterns in Follicular Fluid and Blood Stream in Cycling Mares: A Comparative Note /K.Satué, E.Fazio, A.Ferlazzo, P. Medica// *Journal of Equine Veterinary Science*,2019.-V.80.-P.20-26 doi: 10.1016/j.jevs.2019.06.016
23. Boakari Y.L. Relationships between blood and follicular fluid urea nitrogen concentrations and between blood urea nitrogen and embryo survival in mares/ Y.L.Boakari, H.El-Sheikh Ali, M. Schnobrich, K. Lofrumento, C. Scoggin, E. Bradecamp, K.Scoggin, A.Esteller-Vico, A. Claes, L.Lawrence, B.Ball // *J.Theriogenology*, 2021.-V.160.-P.142-150. doi: 10.1016/j.theriogenology. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.10.039.
- 24.Gautier T., Human luteinized granulosa cells secrete apoB100-containing lipoproteins / Gautier T., Becker S., Drouineaud V., Menetrier F., Sagot P., Nofer J.R., von Otte S., Lagrost L., Masson D. & Tietge U.J.// *Journal of Lipid Research*. -2010.- V.51.-P. 2245–2252. (doi:10.1194/jlr.M005181)
- 25.Yang X., Exposure to lipid-rich follicular fluid is associated with endoplasmic reticulum stress and impaired oocyte maturation in cumulus–oocyte complexes / Yang X., Wu L.L., Chura L.R., Liang X., Lane M., Norman R.J. & Robker R.L. // *Fertility and Sterility*. – 2012,- V.97.- P.1438–1443. (doi:10.1016/j.fertnstert.2012.02.034)
- 26.Le Goff D. Follicular fluid lipoproteins in the mare: evaluation of HDL transfer from plasma to follicular fluid/ D. Le Goff // *J. Biochim. Biophys. Acta*, 1994.-1210(2). P.226-232. DOI: 10.1016/0005-2760(94)90125-2
- 27.Hashimoto, S. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilisation: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. / Hashimoto, S., Minami, N., Yamada, M., Imai, H. // *Mol. Reprod. Dev.* - 2000.- V. 56, P.520–526.
- 28.Leroy J.L. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post-partum. / Leroy J.L., Vanholder T., Delanghe J.R., Opsomer G., Van Soom A., Bols P.E., Dewulf J., de Kruif A. // *Theriogenology*. - 2004, V.62. P.1131-1143.